

Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc

Université El Manar, Faculté des Sciences, Tunis

## **THESE**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Montpellier II et de l'Université El Manar, Tunis

*Discipline : Virologie*

*Ecole doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé*

Présentée et soutenue publiquement par

**Saïda Emna AYARI-FAKHFAKH**

Contribution au développement d'un modèle vaccinal recombinant pour le contrôle des trois infections virales majeures des ruminants, la variole, la PPR et la FVR, adaptés à la situation épidémiologique des pays du Maghreb.

Le 20 Mai 2011

### **Composition du JURY**

<b>Pr M. BERGOIN</b>	UMR 1231, Université de Montpellier II, France	Président
<b>Pr M. MAKNI</b>	Faculté des Sciences de Tunis, Université El Manar, Tunisie	Co-Directeur de thèse
<b>Dr E. ALBINA</b>	CIRAD, UMR CMAEE, Montpellier, France	Co-Directeur de thèse
<b>Dr A. DIALLO</b>	Unité FAO/IAEA, Seibersdorf, Autriche	Rapporteur
<b>Pr J. GHARBI</b>	Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Tunisie	Rapporteur
<b>Dr A. GHARAM</b>	Institut Pasteur, Tunis, Tunisie	Examineur
<b>Dr C. CETRE-SOSSAH</b>	CIRAD, UMR CMAEE, Montpellier, France	Examineur

Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc

Université El Manar, Faculté des Sciences, Tunis

## **THESE**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Montpellier II et de l'Université El Manar, Tunis

*Discipline : Virologie*

*Ecole doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé*

Présentée et soutenue publiquement par

**Saïda Emna AYARI-FAKHFAKH**

Contribution au développement d'un modèle vaccinal recombinant pour le contrôle des trois infections virales majeures des ruminants, la variole, la PPR et la FVR, adaptés à la situation épidémiologique des pays du Maghreb.

Le 20 Mai 2011

### **Composition du JURY**

<b>Pr M. BERGOIN</b>	UMR 1231, Université de Montpellier II	Président
<b>Pr M. MAKNI</b>	Faculté des Sciences de Tunis, Université El Manar, Tunisie	Co-Directeur de thèse
<b>Dr E. ALBINA</b>	CIRAD, UMR CMAEE, Montpellier, France	Co-Directeur de thèse
<b>Dr A. DIALLO</b>	Unité FAO/IAEA, Seibersdorf, Autriche	Rapporteur
<b>Pr J. GHARBI</b>	Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Tunisie	Rapporteur
<b>Dr A. GHAM</b>	Institut Pasteur, Tunis, Tunisie	Examineur
<b>Dr C. CETRE-SOSSAH</b>	CIRAD, UMR CMAEE, Montpellier, France	Examineur

## Table des matières

Remerciements	7
Liste des abréviations	11
Liste des figures et Liste des tableaux	13
<b>Introduction générale à la vaccinologie</b>	22
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b>	26
<b>Chapitre 1 : Introduction générale à la vaccinologie</b>	27
<b><u>I. Bases moléculaires et cellulaires de la réponse vaccinale</u></b>	28
<b><u>II. Les différents types de vaccins et leurs limites</u></b>	32
II.1. Les vaccins vivants atténués	33
II.2. Les vaccins inertes	35
<b>Chapitre 2 : Les vaccins vectorisés utilisés en vaccinologie</b>	39
<b><u>I. Les vaccins recombinants vectorisés par des virus ARN</u></b>	40
I.1. Les Influenza virus en tant que vecteurs	40
I.2. Les Rubella virus en tant que vecteurs	42
I.3. Le virus de la rougeole en tant que vecteur	43
I.4. Exemple d'autres vecteurs	44
<b><u>II. Les vaccins recombinants vectorisés par des virus ADN</u></b>	44
II.1. Les adénovirus	44
II.2. Les poxvirus	47

<b><u>III. Les capripoxvirus</u></b>	52
III.1. Classification	52
III.2. Distribution géographique des capripoxviroses	53
III.3. Etiologie (Structure, Cycle viral)	55
III.3.1. Structure	
III.3.2. Cycle viral	
III.4. Interaction hôte-virus	61
a. Tropisme cellulaire	62
b. Réponse immunitaire induite par les capripoxvirus	65
III.5. Pouvoir pathogène et manifestation clinique	66
III.6. Diagnostic de l'infection	66
III.7. Traitement et Prophylaxie	67
III.8. Exemple particulier du vecteur capripoxvirus KS1	68
 <b><u>IV- La Fièvre de la Vallée du Rift</u></b>	 69
IV.1. Historique de la FVR	69
IV.2. Classification	70
IV.3. Epidémiologie et répartition géographique	70
IV.4. Etiologie du virus de la fièvre de la vallée du Rift	72
IV.4.1. Structure du virus	
IV.4.2. Cycle viral	
IV.5. Réaction immunitaire et physiopathologie	79
IV.6. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques	82
IV.6.1. Chez l'animal	
IV.6.2. Chez l'homme	
IV.6. Diagnostic de l'infection par le virus de la FVR	86

IV.7. Traitement et prophylaxie	88
IV.8. Contrôle de la maladie	90
<b><u>V. La Peste des Petits Ruminants</u></b>	92
V.1 Historique de la PPR	92
V.2 Classification et répartition géographique	93
V.3. Etiologie du virus de la PPR	94
V.3.1 Structure du virus	
V.3.2. Cycle viral	
V.4. Physiopathologie	97
V.4.1 Interactions virus et cellules	
V.4.2 Eléments de pathogénie	
V.5. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques	99
V.6. Diagnostic de l'infection par le virus de la PPR	101
V.7. Traitement et prophylaxie	102
<b>Cadre et Objectifs</b>	104
<b>Partie II : Enquête séroépidémiologique PPR et FVR en Tunisie</b>	107
1. Matériel et Méthodes	108
2. Résultats	111

## **Partie III : Développement de vaccins capripoxvirus recombinants exprimant différents gènes du virus de la FVR et de la PPR : évaluation de l'immunogénicité et de la protection induite *in vivo***

### **Chapitre 1 - Elaboration et validation des constructions plasmidiques *in vitro*** 113

#### **1. Matériel et méthodes** 116

##### **1.1. Virus et cellules**

##### **1.2. Construction des plasmides de transfert** 117

###### 1.2.1. Le plasmide de transfert pKSCATpSGPT

###### 1.2.2. Amplification et clonage du gène H du virus de la PPR

###### 1.2.3. Amplification et clonage des gènes G2/G1 du virus de la FVR

###### 1.2.4. Clonage du marqueur de sélection la généticine GNT ou G418

##### **1.3. Elaboration des capripoxvirus recombinants FVR** 122

###### 1.3.1. Validation de l'expression *in vitro* des capripoxvirus recombinants FVR

###### 1.3.2. Transfection, purification et production des capripoxvirus recombinants FVR

###### 1.3.3. Vérification de la présence des gènes insérés, par PCR

###### 1.3.4. Vérification de l'expression protéique des gènes d'intérêts par immunofluorescence

##### **1.4. Production et titrage des capripoxvirus recombinants** 135

#### **2. Résultats**

##### **2.1. Vérification des constructions plasmidiques** 136

##### **2.2. Validation de l'expression des capripoxvirus recombinants FVR** 141

###### 2.2.1. Expression *in vitro*

###### 2.2.2. Obtention des capripoxvirus recombinants FVR

###### 2.2.2.1. Analyse par immunofluorescence

###### 2.2.2.2. Evaluation par PCR de la pureté

##### **2.3. Purification des capripoxvirus recombinants** 146

###### 2.3.1. Exemple du simple recombinant capripoxvirus FVR élaboré à partir du pKSCATPSgpt-NSmG2 et du KS1

###### 2.3.2. Exemple du bouble recombinant le capripoxvirus FVR-PPR obtenu à partir du pKSCATPSGPT-NSmG2FVR-HPPR

## **Chapitre 2 - Démonstration de l'effet protecteur des capripoxvirus recombinants FVR in vivo avec la construction capripoxvirus simple recombinant FVR**

### **1. Modèle souris MBT/Pas : Immunisations avec la construction vaccinale simple recombinant NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> du virus FVR suivies d'une épreuve infectieuse 151**

#### **1.1. Matériel et méthodes 153**

##### 1.1.1. Modèle d'étude 153

##### 1.1.2. Méthodes 156

##### *1.1.2.1. Evaluation de la réponse immunitaire de type humorale 156*

A - Recherche d'anticorps anti-FVR par neutralisation virale

B- Recherche d'anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence

##### *1.1.2.2. Evaluation de la réponse immunitaire de type cellulaire 157*

##### *1.1.2.3. Evaluation de la protection 161*

#### **1.2. Résultats 162**

##### 1.2.1. Evaluation de la réponse humorale 162

##### *1.2.1.1. Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence*

##### *1.2.1.2. Détection des anticorps anti-FVR par SNT*

##### 1.2.2. Evaluation de la réponse cellulaire 164

##### *1.2.2.1. Etude de la lymphoprolifération*

##### *1.2.2.1.Evaluation des réponses cytokines*

##### 1.2.3.Evaluation de la protection 166

#### **1.3. Conclusion 168**

## **2/ Modèle caprin : Evaluation de l'immunogénicité de la construction vaccinale simple recombinant NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> du virus FVR**

**170**

### **1.1. Matériel et méthodes**

**170**

#### **1.1.1. Modèle d'étude**

**171**

#### **1.1.2. Méthodes**

**172**

##### ***1.1.2.1. Evaluation de la réponse immunitaire de type humorale***

**172**

### **A- Recherche d'anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence**

### **B - Recherche d'anticorps anti-FVR par neutralisation virale**

### **C - Recherche d'anticorps anti-HPPR par ELISA de compétition et neutralisation virale**

##### ***1.1.2.2. Evaluation de la réponse immunitaire de type cellulaire***

**173**

### **1.2. Résultats**

**177**

#### **1.2.1. Evaluation de la réponse humorale**

**177**

##### ***1.2.1.1. Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence***

##### ***1.2.1.2. Détection des anticorps anti- PPR par ELISA de compétition et SNT***

##### ***1.2.1.3.- Détection des anticorps anti-RVF par SNT***

#### **1.2.2. Evaluation de la réponse cellulaire par étude de la lymphoprolifération**

**180**

##### ***1.2.2.1. Etude de la lymphoprolifération***

##### ***1.2.2.2. Evaluation des réponses cytokines***

### **1.3. Conclusion**

**182**

### **Discussion et perspectives**

**183**

### **Références Bibliographiques**

**202**

### **Annexes**

**233**

#### **Annexe 1 : Liste des amorces utilisées**

**Annexe 2 :** Article E. Ayari-Fakhfakh, A.Ghram, A. Bouattour, I.Larbi, L.Gribâa-Dridi, O. Kwiatek b, M. Bouloy, G.Libeau, Emmanuel Albina, Catherine Cêtre-Sossah. 2011. First serological investigation of peste-des-petits-ruminants and Rift Valley fever in Tunisia. *The Veterinary Journal* 187, 402–404.



## **REMERCIEMENTS**

*A vous, jury de thèse qui nous avez fait l'honneur de juger ce travail,  
hommages respectueux.*

***A Monsieur le Professeur Max Bergoin**  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.  
Mes hommages respectueux.*

***A Monsieur le Docteur Emmanuel Albina**  
Qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire et de m'accompagner  
dans ce travail.  
Ce fut un grand plaisir de travailler ensemble.  
Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance profonde et de  
mes sincères remerciements.*

***A Madame le Docteur Catherine Cêtre Sossah**  
Qui a accepté d'encadrer ce travail.  
Ce fut des moments forts partagés.  
Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance profonde et de mes  
sincères remerciements.*

***A Monsieur le Docteur Abdeljelil Ghram**  
Qui m'a toujours soutenu, encouragé et conseillé durant ce travail.  
Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance profonde et de mes  
Sincères remerciements.*

***A Monsieur le Professeur Mohammed Makni**  
Qui nous a ouvert les Grandes Portes de la Faculté de Sciences de Tunis.  
Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance profonde et de mes  
Sincères remerciements.*

***A Monsieur le Docteur Adama Diallo**  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail de thèse.  
Mes hommages respectueux.*

***A Monsieur le Docteur Jawhar Gharbi**  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail de thèse.  
Mes hommages respectueux.*

*Je tiens à remercier **Monsieur Le Docteur Dominique Martínez** qui m'a accueilli  
dans son unité avec beaucoup de gentillesse et de confiance. Veuillez trouver  
dans ce travail l'expression de mes sincères remerciements.*

*Un grand Merci à toutes et tous ceux que j'ai eu l'opportunité de connaître et  
de côtoyer durant ces quatre années de travail  
L'entraide était mutuelle laissant place à une sincère amitié*

*A Catherine,*

*Nous avons partagé des moments inoubliables chargés d'espoir et de désespoir,  
mais nous avons toujours cru à l'aboutissement de ce travail et nous y voilà  
arrivées !*

*Chère Catherine, merci de m'avoir fait partager toutes vos connaissances dans  
le domaine de la recherche et de m'avoir orienté et encadré tout le long de ce  
travail.*

*Merci pour votre aide et votre soutien durant la rédaction de ce manuscrit.  
Ce travail signera toujours entre nous une sincère amitié*

*A Christian,*

*Depuis mes premiers travaux de recherche, tu étais là pour me faire connaître  
et m'apprendre les « Bonnes pratiques de laboratoire » et m'initier à la bonne  
démarche dans un travail de recherche.*

*Au cours de cette thèse, tu as toujours été là aussi pour m'aider et me conseiller.*

*Bref tu m'as toujours accompagné durant ces quatre années de labeur.*

*Je souhaiterais que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sincères  
remerciements*

*A Philippe, A Mathieu, A Valérie,*

*Je tiens à vous remercier pour les moments passés devant le Facs, à toutes les  
connaissances que vous m'avez apprises dans ce domaine. Encore merci pour  
votre patience. Sincères Amitiés*

*A Geneviève, A Cécile,*

*Je tiens à vous remercier pour vos conseils pertinents à chaque fois que je vous ai  
sollicité. Sincères Amitiés*

*A Vincent,*

*Je n'oublierai jamais ta « Fail-safe » qui nous a ouvert les grandes portes  
d'amplification du gène du virus de la Rift et bien sur tous tes plasmides...*

*Je te remercie Vincent et je te souhaite bon courage pour ta thèse*

*A Colette, A Aurélie, A David, A Isabelle, A Philippe, A Renata, A Olivier, A  
Karine, A Patrícia, A Samia, A Sandrine, A Delphine, A Lucia, A Noel, A Thierry,  
Sincères Amitiés.*

*A Karine, A Elvina*

*Je pense à vous les filles et bonne continuation pour terminer la thèse  
Sincères Amitiés*

Dans l'aboutissement de ce travail, je tiens à présenter mes sincères  
remerciements au

*Docteur Michèle Bouloy et à Tanía.*

Veuillez accepter mes sincères gratifications pour votre aide et votre patience

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de microbiologie vétérinaire  
de Tunis en particulier Monsieur le *Docteur Ali Bouattour* pour son aide  
précieuse au cours de l'enquête réalisée sur terrain, *Madame Latifa* pour son  
aide, sa bonne gestion et sa gentillesse

Mes sincères remerciements à tous *les Docteurs Vétérinaires* des CRDA qui ont  
participé à l'enquête sur terrain.

---

*Ce travail je le dédie à ma famille,*

*A papa, qui a nous a quitté très tôt et qui m'a toujours encouragé pour étudier....*

*A maman, qui a toujours été là pour me soutenir, me conseiller et m'aider. Mon absence durant ces années l'a beaucoup affecté mais elle a toujours cru à cet aboutissement.*

*Merci pour tout maman, aujourd'hui je suis là..*

*A Hager et Balou mes deux enfants aînés, je voudrais leur dire que malgré mon absence j'ai toujours été avec eux, et que ce travail est pour eux..*

*Je les embrasse très fort et je veux leur dire que je les aime..*

*A Sarah, ma petite fille combattante, qui a accompagné ce travail de thèse depuis le début. Sa présence à mes cotés dans notre petite chambre de Tropic m'a fait oublier la solitude..*

*Je l'embrasse très fort..*

*A Khalil, tu as toujours été patient et tolérant vis-à-vis de cette situation, tu as su prendre le relais malgré les lourdes tâches de travail que tu as. Je t'en suis fort reconnaissante..*

*A Sonia et Mohammed , ma sœur et mon frère qui m'ont toujours soutenu malgré tout..*

*A toutes mes tantes et tous mes oncles...*

*A Tous mes cousines et cousins...*

*A Rhida, tu n'es plus parmi nous, ta place est vide et elle est énorme, mais ce que tu as laissé est tellement dense.. Je tiens à te remercier du fond du cœur pour tes bons conseils et ton aide qui m'ont permis aujourd'hui de présenter ce travail. Repose toi....*

*A tous mes amies et amis....*

*Je vous remercie,*

---

## Liste des ABREVIATIONS

ARN : Acide RiboNucléique

CEV : Cell-associated Envelopped Virions

CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène

CrmA : Cytokine Response Modifier A

Ct : Cycle threshold

DMEM : Dulbeco, Eagles Modified Medium

*Ecogpt* : *Escherichia coli* guanine phosphoribosyltransferase

EEV : Extracellular Envelopped Virions

EGF : Epidermal Growth Factor

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FVR : Fièvre de la Vallée du Rift

GFP: Green Fluorescent Protein

GM-CSF: Granulocyte Macrophage - Stimulating Factor

GUS: beta glucuronidase

H: Hémagglutinine

ICE: Interleukin 1 $\beta$  Converting enzyme

IEV :Intracellular Envelopped Virions

IF: Immunofluorescence

IFN: Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL: Interleukine

IMV (Intracellular Mature Virions)

i.m. : intra musculaire

i.p.: intra péritonéal

IRES : Internal ribosome entry site

IV : virions immatures

KS-1 : Kenya Sheep-1

LSDV: Lumpy Skin Disease Virus

LTc: Lymphocytes T cytotoxiques

LTh: Lymphocytes T auxiliaires

MEC : Membrane Extra Cellulaire

MLRC : Maladies légalement réputées contagieuses

MOI : Multiplicity Of Infection

NK : Natural Killer

PAMPS : pathogen-associated molecular patterns

PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PRRSV : Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus

PPR : Peste des Petits Ruminants

PS: Promoteur synthétique

RdRp : RNA polymérase dépendante de l'ARN

RE : réticulum endoplasmique

R-IL8: Récepteur à la chimiokine IL-8

RUB : RUBella virus

RVF: Rift Valley Fever

SBF : Sérum de Bovin Foetal

s.c. : sous-cutanée

SLAM : Signaling Lymphocyte Activation Molecule

SNT : Séroneutralisation Virale

Th : T helper

TKd: Partie flanquante de la Thymidine Kinase droite

TKg: Partie flanquante de la Thymidine Kinase gauche

TNF : Tumor Necrosis Factor

UUKV : virus Uukuniemi

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VGF : Vaccinia Growth Factor

VLPs: Virus Like Particles

VRP : Virus-like replicon particles

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Mise en jeu de l'immunité innée et de l'immunité acquise après infection par un pathogène (Abbas <i>et al.</i> , 2000)	28
<b>Figure 2</b> : Induction d'une réponse immunitaire acquise dirigée contre une infection virale (Abbas <i>et al.</i> , 2000).	28
<b>Figure 3</b> : le système « helper-dependent » et le système « helper-independent » des virus Influenza	40
<b>Figure 4</b> : Construction d'un adénovirus recombinant par recombinaison homologue	44
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique du génome de l'AdHu5 et les différentes générations des vecteurs adénovirus	44
<b>Figure 6</b> : Présentation des trois méthodes de construction de poxvirus recombinants. (Drillien <i>et al.</i> , 2003)	47
<b>Figure 7</b> – Distribution géographique de la variole ovine et caprine. (Fassi-Fehri et Lefèvre, 2003)	53
<b>Figure 8</b> - Distribution géographique de la dermatose nodulaire contagieuse (Lefèvre & Gourreau, 2003)	53
<b>Figure 9</b> : Le virus de la vaccine. A: structure du virion ; B: organisation du génome avec une vision élargie du fragment au site de l'enzyme de restriction HindIII (Flint <i>et al.</i> , 2003)	55
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique du cycle de réplication des poxvirus (modèle VACV) (Flint <i>et al.</i> , 2003)	59
<b>Figure 11</b> : L'assemblage et la morphogenèse du VACV	60
<b>Figure 12A</b> : Production des immunomodulateurs sécrétés par les poxvirus	62
<b>Figure 12B</b> : Représentation schématique des immunomodulateurs et régulateurs de l'apoptose sécrétés par les poxvirus. Les symboles rouges représentent les protéines des poxvirus et les symboles noirs et gris représentent les protéines de la cellule hôte (Seet <i>et al.</i> , 2003)	64
<b>Figure 13</b> : Symptômes causés par des infections à poxvirus. A, Chez un bovin atteint de dermatose nodulaire contagieuse (Photo G. Gari, NAHRC, Sebata, Ethiopie) ; B et C, Lésions papulo-vésiculeuses chez une chèvre atteinte de variole caprine (Photo J. Chantal)	66
<b>Figure 14</b> : Distribution de la FVR	70
<b>Figure 15</b> : Cycle viral du virus de la fièvre de la vallée de rift en période enzootique et en période épizootique	70

<b>Figure 16 :</b> Représentation schématique d'une structure d'un Bunyavirus	72
<b>Figure 17 :</b> Représentation schématique du génome FVR de la souche MP12 (Flick and Bouloy, 2005)	72
<b>Figure 18:</b> Morphologie du virus d la fièvre de la vallée du Rift	73
<b>Figure 19 :</b> Expression du génome du virus de la FVR	73
<b>Figure 20 :</b> Processus de réplication et transcription du segment S des Bunyaviridae	75
<b>Figure 21 :</b> Représentation schématique du cycle viral du virus de la FVR	78
<b>Figure 22 :</b> Représentation schématique de l'activation de l'IFN- $\beta$ vis à vis d'une infection virale au sein d'une cellule (Haller <i>et al.</i> 2006)	79
<b>Figure 23 :</b> Représentation des deux principales voies de l'apoptose dans les cellules de mammifères (Hengartner, 2000)	80
<b>Figure 24 :</b> Hépatite nécrosante : foie décoloré et friable (collection département EMVT du CIRAD)	81
<b>Figure 25 :</b> Cas d'épizootie mortelle de FVR chez des veaux	82
<b>Figure 26 :</b> Exemple d'un ovin atteint des signes cliniques de la FVR sous sa forme aigue	83
<b>Figure 27 :</b> Avorton (collection département EMVT du CIRAD)	83
<b>Figure 28 :</b> Rétinite, avec exsudats et hémorragies maculaires et péri-maculaires, chez un patient atteint de fièvre de la Vallée du Rift (Al-Hazmi et al. , 2003 avec la permission de l'éditeur (licence N° 2171210402185)	84
<b>Figure 29 :</b> Diagnostic de la FVR associée aux symptômes chez l'homme et l'animal. A, cinétique de la virémie et de l'apparition des anticorps anti-FVR chez les animaux, B, cinétique des symptômes observés chez les animaux ; C, cinétique des symptômes observés chez l'homme d'après Bird <i>et al.</i> , 2009	85
<b>Figure 30 :</b> Répartition géographique de la PPR en 2008 (Minet <i>et al.</i> , 2009)	92
<b>Figure 31 :</b> Schéma de la structure de Morbillivirus (d'après Diallo <i>et al.</i> , 2003)	94
<b>Figure 32 :</b> Représentation schématique du cycle viral des morbillivirus	95
<b>Figure 33 :</b> Transcription and réplication d'un modèle de morbillivirus: le virus de la rougeole	96
<b>Figure 34 :</b> Jetage mucopurulent (cliché A. Diallo)	99
<b>Figure 35 :</b> Lésions nécrotiques sur la langue d'une chèvre (cliché A. Diallo)	99



<b>Figure 36</b> : Lésions nécrotiques sur la muqueuse buccale (clichés A. Diallo)	99
<b>Figure 37</b> : a. Carte du monde représentant la position de la Tunisie dans le bassin méditerranéen, b. Carte de Tunisie présentant les 6 régions échantillonnées (couleur grise). Les camemberts représentent la distribution des différentes espèces de moustiques identifiées	108
<b>Figure 38</b> - Représentation schématique du plasmide de transfert pKSCATpSGPT, pS: promoteur synthétique; <i>Ecogpt</i> : gène de résistance; TKg: région flanquante côté 5' du gène de la thymidine kinase, TKd: Région flanquante côté 3' du gène TK; Amp <sup>r</sup> : résistance à l'ampicilline.	116
<b>Figure 39</b> : Séquences du gène M trouvées dans les virus recombinants élaborés à partir de la vaccine, A. Représentation schématique du gène M de la FVR, B. Représentation des ATG, C. Taux d'expression en cellules infectées par les virus recombinants FVR-Vaccine (Suzich <i>et al.</i> , 1990)	119
<b>Figure 40</b> : Représentation schématique de l'organisation génique du segment M du virus de la FVR présentant les 4 stratégies de clonage entreprises	120
<b>Figure 41</b> : Représentation schématique des deux stratégies appliquées pour l'élaboration du double recombinant capripoxvirus FVR-PPR	123
<b>Figure 42</b> : Représentation schématique des tailles d'amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR des capripoxvirus recombinants. a. FVR et b. le virus parental KS1 non recombinant	128
<b>Figure 43</b> : Représentation schématique des tailles d'amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR des capripoxvirus recombinants. a. PPR et b. le virus parental KS1 non recombinant	129
<b>Figure 44</b> : Représentation schématique des tailles d'amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR. a. virus recombinant CpoX HPPR en RIL8 et FVR en TK. b. le virus parental KS1	131
<b>Figure 45</b> : Représentation schématique des tailles d'amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR. a. virus simple recombinant CpoX HPPR en RIL8. b. virus recombinant CpoX HPPR en RIL8 et FVR en TK	134
<b>Figure 46</b> : Gel Agarose 1% BET présentant le criblage de colonies bactériennes, par PCR, au cours de la transformation du pKSCATpSGPT-NSmG2	135
<b>Figure 47</b> : Double digestion enzymatique par SpeI NotI du plasmide pKSCATpSGPT-NSmG2	
<b>Figure 48</b> : Amplification de la généticine à partir du Ptopoxl	136
<b>Figure 49</b> : Gel agarose 1%+BET illustrant la création du site XhoI par mutagenèse dirigée dans le plasmide de transfert pKSCATpSGPT	137
<b>Figure 50</b> : Gel agarose 1%+BET présentant les clones bactériens ayant intégré le gène de la G418 en pKSCATpSGPT dans les 6 clones testés	137

<b>Figure 51 :</b> Présentation des 4 plasmides de transfert construits pour l'élaboration du double recombinant capripoxvirus FVR PPR	139
<b>Figure 52 :</b> Détection par immunofluorescence de l'expression de la glycoprotéine G2 dans des cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGNT-NSmG2G1 et le plasmide pKSCATpSGNT-NSmG2	140
<b>Figure 53 :</b> Mise en évidence du gène NSmG2 dans le plasmide de transfert pKSCATPSGNT sur gel agarose 1%+BET	141
<b>Figure 54 :</b> Effet cytopathique observé sur des cellules OA3Ts infectées par le recombinant CpoX-NSmG2, en milieu sélectif liquide	142
<b>Figure 55 :</b> Détection des anticorps anti- G2 par IF dans des cellules OA3.Ts infectées par une suspension virale du simple recombinant CpoX-FVR	143
<b>Figure 56 :</b> Révélation de l'expression de la glycoprotéine G2 et de l'hémagglutinine H par IF dans le cas d'un double recombinant RecCpoX-NSmG2-HPPR	143
<b>Figure 57 :</b> Amplification par PCR spécifique du fragment NSmG2 dans les 8 clones simple recombinants Rec CpoXNSmG2	144
<b>Figure 58 :</b> Amplification par PCR spécifique du fragment NSmG2 dans 5 des 6 double Rec CpoXNSmG2-HPPR	144
<b>Figure 59 :</b> Amplification par PCR avec les amorces TK9/TK10, spécifique du virus parental KS1 obtenue au cours du processus de purification du recombinant CpoXNSmG2	145
<b>Figure 60 :</b> Amplification par PCR de 5 recombinants CpoXNSmG2 purs	146
<b>Figure 61 :</b> Amplification par PCR spécifique de NSmG2 lors du processus de purification des virus double recombinants sélectionnés	147
<b>Figure 62 :</b> Expression de la glycoprotéine G2 par IF	149
<b>Figure 63 :</b> Souris de la lignée MBT/Pas utilisée lors de nos essais expérimentaux	152
<b>Figure 64 :</b> Calendrier de la première expérimentation animale réalisée chez les souris MBT	155
<b>Figure 65 :</b> Calendrier de la seconde expérimentation animale réalisée chez les souris MBT	155
<b>Figure 66 :</b> Technologie BD CBA. Représentation graphique de la gamme standard pour 3 points 0, 80, 625 et 5000 pg/ml (a), des différents pics spécifiques de chacune des cytokines testées, dans notre cas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et TNF (b)	158
<b>Figure 67 :</b> Technologie BD CBA. Représentation graphique de la gamme standard pour chacune des cytokines testées, dans notre cas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et TNF.	159
<b>Figure 68 :</b> Prolifération des lymphocytes de type CD4 (a) et de type CD8 (b) après restimulation avec les préparations antigéniques de virus FVR	163

<b>Figure 69 :</b> Calendrier expérimental de l'essai capripoxvirus simple recombinant FVR chez la chèvre	169
<b>Figure 70 :</b> Les chèvres de l'expérimentation	170
<b>Figure 71 :</b> Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence dans les sérums caprins au cours des essais expérimentaux <i>in vivo</i> chez la chèvre	176
<b>Figure 72 :</b> Prolifération des lymphocytes après restimulation avec les préparations antigéniques de virus FVR	180
<b>Figure 73:</b> Prolifération des lymphocytes après restimulation avec les préparations antigéniques de virus KS-1	181

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Propriétés des sous-populations Th1/Th2(Mosmann, <i>et al.</i> ,1986)	32
<b>Tableau 2</b> - Classification de la sous-famille des <i>Chordopovirinae</i> -Adapté de Bertagnoli, 2003	52
<b>Tableau 3</b> : Espèces affectées par le virus FVR et sensibilité observée (Swanepoel &Coetzer, 1996)	81
<b>Tableau 4</b> : Répartition géographique des échantillons analysés (serum et pièges). <i>Ae. Correspond à Aedes, An. À Anopheles, et Cx. pour Culex.</i> Le nombre présenté entre parenthèses correspond au nombre total d'animaux répertoriés dans les régions choisies	109
<b>Tableau 5</b> : Séroprévalence PPR	111
<b>Tableau 6</b> : Combinaisons possibles pour la mise au point de la méthode de greffage de la souche de FVR Smithburn par les billes magnétiques de type Adembeads	126
<b>Tableau 7</b> : Liste des amorces et des tailles attendues pour les PCR de sélection/purification lors du processus de sélection du simple recombinant PPR	128
<b>Tableau 8</b> : Liste des amorces et des tailles attendues pour les PCR de sélection/purification lors du processus de sélection du simple recombinant PPR	130
<b>Tableau 9</b> : Liste des amorces et des tailles attendues pour les PCR de sélection/purification lors du processus de sélection du double recombinant FVR-PPR	132
<b>Tableau 10</b> : Liste des amorces et des tailles attendues pour les PCR de sélection/purification lors du processus de sélection permettant de distinguer le simple recombinant HPPR du double recombinant FVR-PPR	133
<b>Tableau 11</b> : Liste des Anticorps utilisés pour le typage des populations lymphocytaires chez la souris	157
<b>Tableau 12</b> : Titres viraux obtenus en FVR par neutralisation virale lors de la première expérimentation chez les souris immunisées par le capripoxvirus Cpox-NSmG <sub>N</sub> recombinant FVR (Groupe Test) et le capripoxvirus Cpox-H-PPR (Groupe Témoin)	160
<b>Tableau 13</b> : Titres viraux obtenus en FVR par neutralisation virale lors de la seconde expérimentation chez les souris immunisées par le capripoxvirus Cpox-NSmG <sub>N</sub> recombinant FVR (Groupe Test) et le capripoxvirus Cpox-H-PPR (Groupe Témoin)	161
<b>Tableau 14</b> : Dosage des cytokines sécrétées à partir des surnageants de culture restimulés in vitro pour l'expérimentation 1	164
<b>Tableau 15</b> : Dosage des cytokines sécrétées à partir des surnageants de culture restimulés in vitro pour l'expérimentation 2. Test Mann-Whitney * $p < 0.05$	165

<b>Tableau 16</b> : Suivi de la mortalité des souris MBT/Pas suite à l'épreuve infectieuse FVR lors de la première expérimentation	166
<b>Tableau 17</b> : Suivi de la mortalité des souris MBT/Pas suite à l'épreuve infectieuse FVR lors de la seconde expérimentation	167
<b>Tableau 18</b> : Liste des Anticorps utilisés pour le typage des populations lymphocytaires chez la chèvre	174
<b>Tableau 18bis</b> : Liste des conditions utilisées pour la quantification par RT-QPCR SybrGreen	175
<b>Tableau 19</b> : Résultats qualitatifs des IF menées en cinétique sur les sérums des 2 groupes de chèvre testés	177
<b>Tableau 20</b> : Résultats quantitatifs des ELISA de compétition H exprimés en Pourcentage d'inhibition	177
<b>Tableau 21</b> : Titres viraux en PPR, obtenus par neutralisation virale lors de l'essai expérimental chez les chèvres	178
<b>Tableau 22</b> : Titres viraux obtenus en FVR par neutralisation virale chez les chèvres immunisées par le capripoxvirus Cpox-NSmG <sub>N</sub> recombinant FVR (Groupe Test) et le capripoxvirus Cpox-H-PPR (Groupe Témoin)	179

Ce travail a été réalisé au  
Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le  
Développement, CIRAD, Montpellier, France  
en cotutelle avec l'Université El Manar, Faculté des Sciences, Tunis, Tunisie  
et l'institut Pasteur de Tunis, Tunisie

Dans l'unité mixte de recherche CIRAD/INRA  
« Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes » et plus  
particulièrement au sein de l'équipe virologie

Sous la direction d'Emmanuel ALBINA AVEC  
l'encadrement de Catherine CETRE-SOSSAH

Ce travail a été financé par un projet CMCU, une bourse Averroes, une bourse  
RIIP du réseau des Instituts Pasteur

### Programme Utique



## **INTRODUCTION GENERALE**

## Introduction générale

La vaccination, lorsqu'elle est disponible, compte parmi les moyens les plus économiques et les plus fiables pour prévenir, maîtriser et même, dans certains cas, éradiquer les maladies infectieuses quelque soient leurs origines.

En santé animale, ces dernières années, la vaccination a même été utilisée à d'autres fins telles que le bien être des animaux comme l'immunocastration (Pastoret, 2009).

Néanmoins, face à l'émergence ou à la réémergence de certaines infections parfois responsables de zoonoses, les stratégies de vaccination deviennent de plus en plus complexes. Les flambées de maladies causées par des agents pathogènes présentant une grande diversité antigénique mais aussi de maladies dites vectorielles suscitent de nombreuses questions quant à leurs contrôles et leurs suivis via une vaccination efficace.

Les changements globaux résultant de la mondialisation, les bouleversements climatiques conduisant à une modification des écosystèmes ont considérablement changé la distribution et la configuration des maladies. Ces grandes perturbations ont également largement contribué à l'émergence de nouveaux agents pathogènes qui se sont adaptés à un nouvel environnement biologique. L'exemple de la fièvre catarrhale ovine (FCO) dans la partie Nord de l'Europe, la fièvre de la vallée du Rift (FVR) au Moyen-Orient, la Peste des Petits Ruminants (PPR) en Afrique du Nord peuvent illustrer ces propos.

Finalement et suite à ces bouleversements, on assiste aujourd'hui à une extension géographique de pathologies infectieuses, particulièrement d'origine virale, à partir de leur berceau natal. Les exemples sont nombreux et variés, la fièvre du Nil occidental (WN), la fièvre hémorragique Crimée-Congo (CCHF), la Fièvre de la Vallée de Rift (FVR) et la Peste des Petits Ruminants (PPR) et les poxviroses. Tous ces cas constituent des exemples pertinents à étudier. Cette thèse s'intéresse plus particulièrement à la FVR et la PPR, maladies virales ayant une répartition géographique commune, cantonnée en Afrique subsaharienne.

La fièvre de la vallée de rift (FVR) est une arbovirose avec une transmission du virus résultant essentiellement d'un contact entre un hôte et un vecteur. Listée dans les maladies à déclaration de l'Office International des Epizooties (OIE), elle est également une zoonose mortelle pour l'homme. Les facteurs favorisant le développement de la maladie sont un nombre suffisant d'hôtes réceptifs mais également la présence d'insectes vecteurs compétents. Depuis son apparition en 1932 au Kenya dans la vallée de Rift, la distribution de la FVR a



toujours été limitée à l'Afrique subsaharienne où elle évolue désormais sous forme épizootique, à l'exception de l'Afrique du Sud où elle se présente sous forme enzootique. Cependant, depuis 2000, les dogmes épidémiologiques ont changé, puisque cette dernière fait sa première apparition au Moyen Orient, Arabie Saoudite et Yémen. Plusieurs facteurs d'origine climatique et environnementale sont responsables de l'extension de la répartition de la FVR ce qui fait de cette maladie une véritable menace pour tous les continents.

La peste des petits ruminants (PPR) est une autre maladie virale, à transmission directe et contagieuse comme la FVR et à déclaration obligatoire pour l'OIE. Responsable d'atteintes cliniques graves, elle engendre des conséquences directes sur le maintien de l'activité d'élevage et indirectes par l'application locale de mesures de contrôle restrictives et de mise en place de barrières sanitaires pour l'échange commercial d'animaux. Les taux de morbidité et de mortalité peuvent atteindre respectivement 80% et 90-100%. La PPR, sévissant jusqu'à présent en Afrique, au Moyen Orient et en Asie, est en expansion. Elle commence à alarmer et préoccuper aussi bien les pays européens suite à son apparition en Turquie en 2004, que les pays d'Afrique du Nord suite à l'épizootie en 2008, au Maroc (Sanz-Alvarez *et al.*, 2008).

Ainsi, pour faire face à une éventuelle émergence de ces deux infections virales, une approche intégrée sera nécessaire permettant le contrôle de ces deux pathologies à la fois par protection des espèces sensibles et réceptives et par l'étude de la dynamique de populations de vecteurs impliqués dans leur transmission. Concernant la protection des espèces par la vaccination, de nombreuses technologies ont été mises en avant. Toutes présentent aussi bien des avantages que des inconvénients.

Face à ce contexte incertain, le choix de mon travail de recherche porte sur la conception d'un vaccin ciblant à la fois la FVR et la PPR. Le premier critère de choix fut la superposition de leur distribution géographique, leur importance clinique, leurs espèces cibles communes, leur forte contagiosité les classant en tant que maladies légalement réputées contagieuses (MLRC) et leur fort impact socio-économique dans les pays atteints. Pour se faire, une stratégie de vaccins vectorisés a été envisagée. Le modèle du vecteur capripoxvirus a été choisi. Il a, par ailleurs, déjà fait ses preuves dans la conception de vaccins recombinants pour la PPR et la FCO respectivement (Diallo *et al.*, 2002; Berhé G. *et al.*,

2003 ; Perrin *et al.*, 2007). Les vecteurs poxviraux sont à l'origine de vaccins commercialisés pour certaines pathologies. Plusieurs exemples en témoignent tels que :

- le fowlpoxvirus recombinant exprimant la protéine H5 du virus de l'influenza aviaire (vaccin commercialisé par Merial) (Bublot, *et al.*, 2006)
- le canarypoxvirus utilisé contre le virus de l'influenza équine et la fièvre du Nil occidental (vaccin commercialisé par Merial) (Minke *et al.*, 2004b)
- le virus de la vaccine recombinant exprimant la protéine G du virus de la rage (vaccin commercialisé par Merial) (Mackowiak *et al.*, 1999)

L'élaboration d'un vaccin capripoxvirus double recombinant FVR-PPR relève d'un triple intérêt:

- il constitue une nouvelle approche pour étudier la capacité du vecteur capripoxvirus à protéger contre un nouveau transgène, celui de la FVR.
- il permet d'évaluer la protection conférée par le vecteur capripox en intégrant deux valences par recombinaison homologue dans 2 sites d'insertion distincts
- il est thermostable, aspect non négligeable pour son utilisation dans les pays du Sud et injectable en 1 seule fois pour induire une protection

Ce mémoire de thèse est divisé en trois grandes parties. Une première partie bibliographique rédigée en deux chapitres, le premier décrivant l'histoire de la vaccinologie, ses principes, les différents types de vaccins et leurs limites. Le deuxième chapitre s'intéresse aux vaccins vectorisés ; plus particulièrement aux poxvirus et leur implication en faveur de deux maladies virales, la FVR et la PPR.

La seconde partie du mémoire traitera de l'enquête séroépidémiologique réalisée sur la PPR et le FVR en Tunisie et sera elle-même divisée en 2 parties, Matériel et Méthodes et Résultats. Une troisième partie traitera du développement des vaccins capripoxviraux recombinants avec l'évaluation de l'immunogénicité et de la protection de ces constructions. Cette dernière partie sera divisée en 2 chapitres, un premier chapitre sur l'élaboration et la validation des constructions plasmidiques *in vitro* et un second chapitre qui s'adressera à la démonstration de l'effet protecteur des capripoxvirus recombinants FVR *in vivo* avec les résultats et difficultés rencontrées. Enfin, une discussion largement argumentée par rapport aux travaux de recherche élaborés et apparentés à ce sujet ainsi que les perspectives de ce travail seront présentées dans le 3ème chapitre. Une conclusion générale terminera cet écrit.

## **PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Partie I : Synthèse bibliographique**

### **Chapitre 1 : Introduction générale à la vaccinologie**

#### **La naissance de la vaccination :**

La découverte de la vaccination est généralement attribuée à Edward Jenner, médecin anglais, qui découvrit en 1796, que le virus de la vaccine responsable de la variole chez la vache (*Vacca*, vache en latin) engendrait chez l'homme une protection contre la variole humaine. Le 14 mai 1796, E. Jenner inocula à un enfant du pus prélevé sur la main d'une fermière infectée par le virus de la vaccine. Trois mois plus tard, il inocula la variole à l'enfant qui se révéla protégé contre la maladie. Il nomma ce procédé « vaccination ». Trois quarts de siècle plus tard, Louis Pasteur prit pour point de départ les travaux de E. Jenner pour établir le principe des vaccinations préventives et étendit ce terme à l'induction de la protection contre d'autres agents infectieux.

En 1967, débute une campagne visant à éradiquer la variole. Au cours de la première année du Programme Intensif d'Eradication de la variole, on dénombrait 131 789 cas de variole dans 44 pays dont 31 dans lesquels la maladie sévissait de façon endémique (le Brésil, la plupart des pays d'Afrique sub-saharienne, l'Inde, l'Indonésie, le Népal et le Pakistan). La transmission de la maladie fut interrompue en Ethiopie en 1976, et en Somalie le 26 octobre 1977, date du dernier cas de variole naturelle. Le 29 octobre 1979, l'OMS déclara la variole éradiquée de la surface de la Terre. La vaccination fut interrompue le 8 mai 1980 (Stewart & Devlin, 2006).

Ce formidable exemple des campagnes de vaccination mises en place contre la variole, basé sur la protection croisée du virus de la variole et du virus de la vaccine d'origine bovine a montré toute son efficacité. Un certain nombre de vaccins ont ensuite été générés sur le même principe.

Faisant suite à cette première révolution, Louis Pasteur a mis au point le premier vaccin contre la rage et la première vaccination de l'homme contre ce virus a eu lieu en 1885. En 1932, un vaccin contre le virus de la fièvre jaune a été conçu par Jean Laigret. Les évolutions pasteurienues s'enchainent et, c'est en 1954 qu'un vaccin contre le virus responsable de la

poliomyélite a été élaboré par Pierre Lépine. D'autre part, le principe des vaccinations associées et du rôle de substances adjuvantes de l'immunité ont été étudiées depuis 1922 par Gaston Ramon. Par ailleurs, la découverte fortuite de la possibilité d'atténuer les pathogènes dans certaines conditions expérimentales (atténuation par passages sur supports cellulaires ou inactivation par voie chimique ou physique, a permis de progresser jusqu'aux vaccinations actuelles.

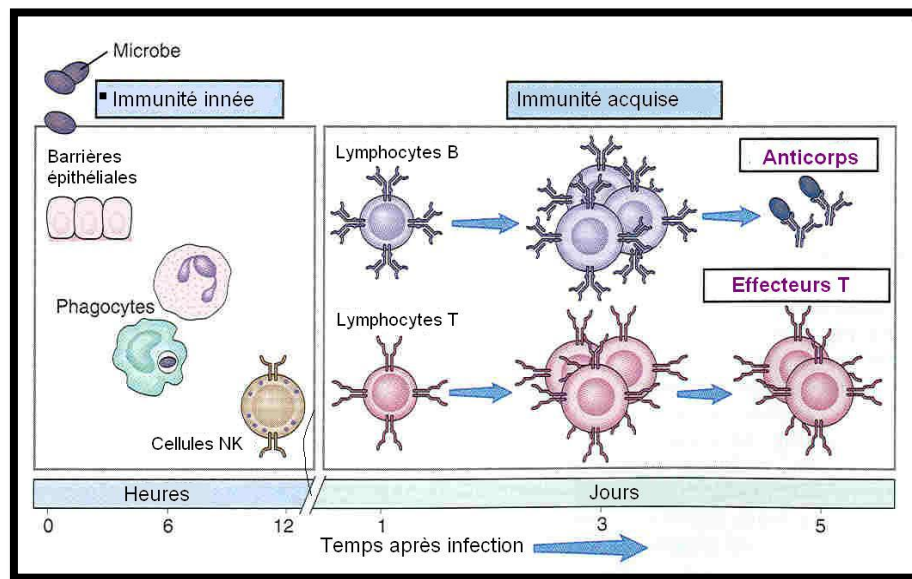
## **I. Bases moléculaires et cellulaires de la réponse vaccinale :**

L'utilisation de vaccins fait partie d'une stratégie de lutte intégrée contre un agent pathogène. Au niveau individuel, le vaccin protège l'individu vacciné contre l'infection et, au niveau collectif par son utilisation massive lors de campagnes de vaccination ciblées, le vaccin diminue la circulation du pathogène au sein d'une population (par diminution de l'excrétion de l'agent pathogène). Son principe est simple, il consiste en l'introduction, dans un organisme vivant, d'antigènes ou de fragments immunogènes d'un agent pathogène, en vue de la stimulation d'une immunité protectrice spécifique contre ce pathogène. Elle sollicite donc la constitution d'une immunité acquise ou adaptative.

A titre de rappel, la réponse immunitaire des vertébrés vis-à-vis d'un pathogène se caractérise par la coexistence d'une immunité innée et d'une immunité acquise, toutes les deux sont complémentaires et coopératives. Le système immunitaire inné, plus ancien sur le plan évolutif, constitue une première défense contre les agents infectieux. Activé très précocement après l'entrée du pathogène à travers la peau ou les muqueuses (Figure 1), il est dirigé contre des structures partagées par des groupes de pathogènes et met en jeu la phagocytose des micro-organismes par les phagocytes (macrophages ou polynucléaires neutrophiles), la cytotoxicité naturelle des cellules NK et l'activation du système du complément principalement. Le système immunitaire inné va également réguler et orienter la réponse acquise.

Le système immunitaire acquis n'intervient que plusieurs jours après l'infection, après stimulation au niveau des organes lymphoïdes des cellules lymphocytaires spécifiques et ayant une forte affinité pour les antigènes. Ce système possède de plus une mémoire, capable d'amplifier et d'accélérer la réponse immunitaire lors d'un contact ultérieur avec le même

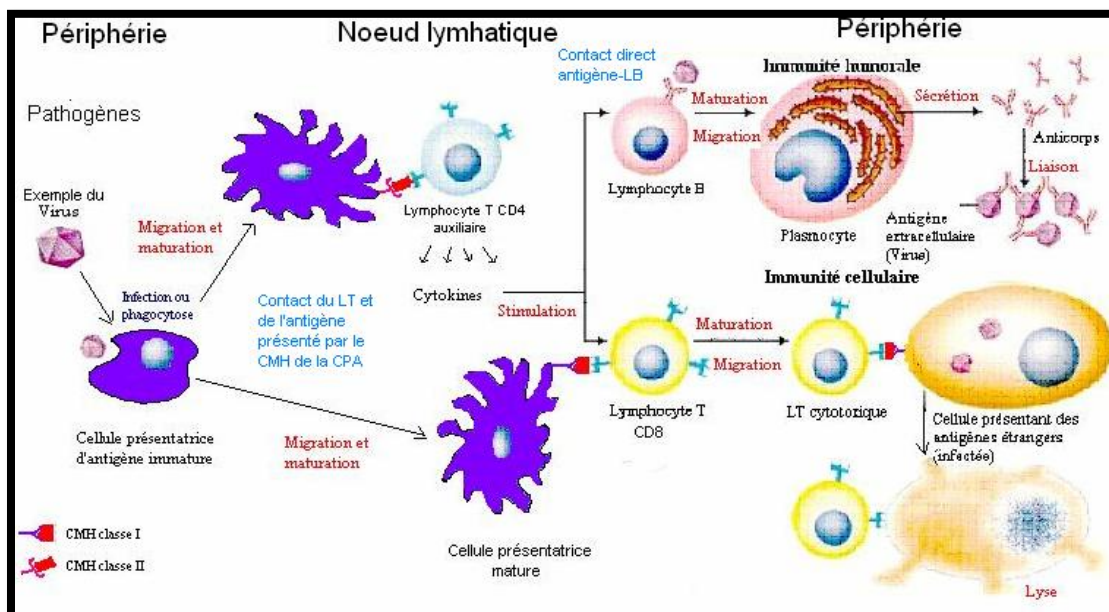
pathogène. Les autres particularités de ce système sont sa diversité, caractérisée par un large répertoire lymphocytaire (pouvant reconnaître jusqu'à  $10^9$  à  $10^{11}$  antigènes différents).



**Figure 1 :** Mise en jeu de l'immunité innée et de l'immunité acquise après infection par un pathogène (Abbas *et al.*, 2000)

La réponse immunitaire acquise peut être schématisée en deux :

- la réponse immunitaire à médiation humorale (RIMH), caractérisée par la sécrétion d'anticorps
- la réponse immunitaire à médiation cellulaire (RIMC), aboutissant à la lyse des cellules présentant des antigènes étrangers (Figure 2)



**Figure 2 :** Induction d'une réponse immunitaire acquise dirigée contre une infection virale. (Abbas *et al.*, 2000)

La RIMH assure la protection contre les pathogènes extracellulaires et les toxines grâce à la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B activés. Elle nécessite la reconnaissance directe de l'antigène par un lymphocyte B spécifique, ce qui entraîne la maturation et la différenciation de cette cellule en plasmocyte sécréteur d'anticorps après coopération avec des lymphocytes T auxiliaires. Les anticorps produits peuvent :

- neutraliser un pathogène libre en se fixant à sa surface et en bloquant ainsi sa liaison sur les cellules cibles (Burton *et al.*, 2000)
- entraîner l'opsonisation des pathogènes, ce mécanisme correspondant à une phagocytose entraînée par les anticorps
- provoquer la lyse des pathogènes complexés aux anticorps après activation de la voie du complément.

Il existe à ce jour 5 types d'anticorps ou immunoglobulines (Ig) : IgA, D, E, G et M. Les IgM sont présentes sur les lymphocytes B non activés et correspondent aux premières immunoglobulines synthétisées lors d'une première stimulation antigénique (lors d'une première vaccination par exemple), alors que les IgG, plus affins, sont les anticorps les plus abondants produits après les IgM dans la cinétique d'infection par un agent pathogène.

La RIMC intervient dans la détection de pathogènes intracellulaires ou de cellules tumorales, à la suite d'une présentation d'antigènes anormaux à la surface des cellules. Elle a pour point de départ l'interaction d'un lymphocyte T avec une cellule présentatrice d'antigènes (CPA), spécialisée comme un macrophage ou une cellule dendritique, ou une CPA non spécialisée. La cellule dendritique constitue la CPA la plus efficace pour la stimulation des lymphocytes T naïfs. La reconnaissance par le lymphocyte T à la surface de la CPA mature d'un peptide provenant de la fragmentation de l'antigène anormal est complexé à une molécule de l'hôte, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) conduit à sa stimulation. Dans le cas d'un lymphocyte T CD8+, cette reconnaissance passe par la présentation peptidique dans le contexte du CMH de type I. Par la suite, la présentation du peptide anormal dans le même contexte à la surface de cellules infectées aboutit à la lyse de la cellule inspectée par le lymphocyte T CD8+ cytotoxique (LTc) activé. Cette lyse découle soit d'un processus direct basé sur des altérations de la membrane plasmique par la perforine ou le granzyme libérés par le LTc ou indirect suite à l'envoi d'un signal de mort cellulaire ou apoptose en empruntant la voie du Tumor Necrosis Factor (TNF), par exemple. En effet, les lymphocytes T activés à la suite de la reconnaissance spécifique de l'antigène et les CPAs, produisent de nombreux

médiateurs solubles appelés « lymphokines » dont certains faciliteront la réponse des lymphocytes B face au même antigène. Cette coopération étroite et réciproque entre les cellules T et les cellules B-en effet si les produits de sécrétion des lymphocytes T aident à la maturation des lymphocytes B en Cellules productrices d'anticorps, il a été démontré que les lymphocytes B et anticorps interviennent dans la sélection puis le maintien du répertoire T d'un individu (Martinez *et al.*, 1988)- rend donc inadéquate la totale séparation de l'immunité humorale et cellulaire. En réalité, cette distinction se fait sur la base de la nature (humorale ou cellulaire) des mécanismes effecteurs impliqués dans la protection contre l'agent pathogène. La réponse immunitaire est alors orchestrée en fonction du pathogène et de sa localisation intra ou extracellulaire, de la voie de présentation de l'antigène et donc du type de pathogène ou vaccin administré.

### **Notions Th1/Th2**

Quelques définitions semblent nécessaires et indispensables en préambule à la réponse immunitaire spécifique développée chez différents hôtes vis-à-vis de différents microorganismes.

#### *Réponse cellulaire de type Th1/Th2*

La différenciation des cellules TCD4<sup>+</sup> naïves dans les 2 classes principales de cellules TCD4<sup>+</sup> effectrices a lieu lors de la première réponse de ces cellules à l'antigène dans les tissus lymphoïdes périphériques. Les éléments qui déterminent si une cellule TCD4<sup>+</sup> va se différencier en Th1 ou Th2 ne sont pas encore entièrement connus. En particulier, la décision de se différencier en Th1 plutôt qu'en Th2 se prenant tôt au cours de la réponse immunitaire, les cytokines produites en réponse au pathogène par les cellules de l'immunité innée jouent un rôle très important dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. Les conséquences de l'orientation vers Th1 plutôt que vers Th2 sont importantes : la production de cellules Th1 conduit à une immunité de type cellulaire alors que la production préférentielle de cellules Th2 conduit à une immunité de type humoral.

#### *Définitions des profils de cytokines*

Les cytokines aussi différentes soient elles par leurs sources cellulaires que par leurs activités biologiques sont fondamentales pour l'activation et/ou la régulation des cellules effectrices du système immunitaire. C'est principalement par leur intermédiaire que les lymphocytes Th1 et Th2 vont induire la mise en place et à la régulation de nombreux mécanismes effecteurs du système immunitaire en réponse à la stimulation antigénique. La nature de ces cytokines



définissent le développement d'une réponse de type Th1 ou Th2. Ces cytokines sont également impliquées dans la régulation des lymphocytes Th1 et Th2 eux-mêmes.

- *Profil Th1/Th2*

En 1986, Mosmann, *et al.*, démontraient chez la souris l'existence de 2 sous-populations lymphocytaires TCD4<sup>+</sup> auxiliaires (T helper) Th1 et Th2, caractérisées par leur dichotomie fonctionnelle suivant le profil de cytokines secrétées illustrées dans le tableau 1. Cette dichotomie se traduit par une sécrétion de différentes cytokines. Ainsi, les cellules Th1, impliquées dans les réponses immunes à médiation cellulaire particulièrement lors d'infections par des pathogènes intracellulaires et dans les réactions d'hypersensibilité retardée, se caractérisent par la sécrétion d'IL-2, IFN $\gamma$ , et IL-12. Quant aux cellules Th2, elles jouent un rôle dans l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et interviennent lors d'infections par les helminthes ou manifestations allergiques par la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 (Mosmann & Coffman, 1989 ; Cherwinski *et al.*, 1987, Fiorentino *et al.*, 1989). Ces 2 sous-populations produisent toutes 2 de l'IL-3, IL-10, GM-CSF, TNF $\alpha$ .

- *Profil Th0*

D'autres profils de cytokines ont également été mis en évidence. Un profil Th0 a été défini chez la souris (Firestein *et al.*, 1989) et chez l'homme (Paliard *et al.*, 1988) comme étant un profil intermédiaire entre les profils Th1 et Th2, où les cellules produisent simultanément de l'IL-2, de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-4. Ces cellules pourraient être des précurseurs des lymphocytes effecteurs Th1 et Th2 (Abehsira-Amar *et al.*, 1992), mais aussi des lymphocytes effecteurs à part entière en sécrétant un profil de cytokines non restreint (Kelso *et al.*, 1991).

## **II. Les différents types de vaccins et leurs limites**

L'immunisation vaccinale est basée principalement sur deux grands types de vaccins : les vaccins vivants et les vaccins inerts. Les avancées en immunologie et en infectiologie permettent de mieux comprendre les interactions hôte-pathogène. L'amélioration des techniques de production industrielle de vaccins ne cessent de faire évoluer et de susciter de nouvelles approches vaccinales

	Th1	Th2
--	-----	-----

<b><u>Lymphokines</u></b>		
IL-2	+	-
IFN $\gamma$	+	-
TNF $\beta$	+	-
IL-4	-	+
IL-5	-	+
IL-6	-	+
IL-10	-/+	+
IL-3	+	+
GM-CSF	++	+

**Tableau 1** : Propriétés des sous-populations Th1/Th2(Mosmann, *et al.*,1986)

### **II.1. Les vaccins issus d'agents vivants atténués :**

Ce sont les ancêtres de la prophylaxie préventive. Ils reposent sur l'utilisation d'un microorganisme apparenté apathogène ou peu pathogène pour l'espèce cible, ou d'un microorganisme atténué par passages successifs en culture cellulaire ou sur une espèce différente de l'espèce cible, permettant alors l'apparition et la sélection de mutants avirulents ou très peu virulents. Ces virus atténués gardent la capacité de se multiplier chez l'hôte avec un fort potentiel répliatif associé à l'induction d'une bonne réponse immunitaire humorale et cellulaire, proche de celle observée dans la nature contre le pathogène ciblé. Ils agissent à faible dose et sont généralement protecteur à dose unique. Ils sont dotés d'un large spectre de modes d'administration (voie orale, intramusculaire, intradermique). Les principaux vaccins vivants à visée humaine sont ceux contre le virus de la grippe saisonnière ,la rougeole, les oreillons, la rubéole (ROR), la fièvre jaune, la varicelle, la tuberculose (vaccin BCG), la poliomyélite (vaccin oral), les gastroentérites à Rotavirus. Malgré leur atténuation, ces souches peuvent garder un pouvoir de virulence résiduelle qui pourrait conduire une réversion de virulence par un retour au phénotype sauvage. L'exemple dans le monde vétérinaire a eu lieu lors de la vaccination contre le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP). En effet, la vaccination des porcs reproducteurs avec virus vivant atténué a été responsable de la propagation de l'infection de troupeaux vaccinés danois

vers des troupeaux non vaccinés (Mortensen *et al.*, 2002). Ce risque est d'autant plus important avec les virus à ARN qui présentent un taux élevé de mutations spontanées (Els *et al.*, 2007). Leur atténuation doit agir sur un grand nombre de mutations réparties sur la totalité du génome ce qui a été prouvé avec la souche du vaccin RBOK de Plowright et Ferris employée entre le 90<sup>ème</sup> et le 122<sup>ème</sup> passage produit en culture cellulaire et lyophilisé pour l'éradication de la peste bovine (Baron *et al.*, 2005). Une grande partie des vaccins développés dans le domaine de la bactériologie sont des vaccins constitués de sous-unités. Cependant certains vaccins sont des vaccins vivants atténués produits à partir de souches sauvages. La souche 34F2 obtenue par Sterne en 1937 protège contre la fièvre charbonneuse et est couramment utilisée (Turnbull *et al.*, 1991). La souche T1-44 protégeant contre la péripneumonie contagieuse bovine est également recommandée par la FAO et l'OIE (Provost *et al.*, 1987). Cependant, la mise au point de vaccins atténués antibactériens s'est révélée assez difficile. A titre d'exemple, une tentative de vaccins avec la souche bactérienne *Lawsonia intracellularis* responsable de l'entéropathie proliférative porcine n'a pu aboutir, les caractéristiques phénotypiques et génotypiques entre la souche vaccinale et la souche sauvage n'ayant pu être identifiées (Els *et al.*, 2007). Il existe à ce jour un seul vaccin anti-bactérien de ce type largement utilisé chez l'homme : le vaccin contre la tuberculose ou B.C.G (bacille de Calmette-Guérin) (<http://www.pasteur.fr>).

Le monde de la vaccination animale anti-parasitaire est tout autre, ceci malgré le degré élevé de complexité génétique des parasites. Le développement de vaccins protégeant contre les parasites protozoaires reste toujours un grand défi étant donné la variabilité antigénique de ces microorganismes au cours des différents stades de leur cycle de vie à l'intérieur de l'hôte. Une grande hétérogénéité persiste également entre les différentes souches parasitaires. Afin de pouvoir contourner toutes ces variabilités, divers types de stratégies vaccinales ont été élaborées avec des modes d'action variables en fonction des types de parasites :

- une vaccination qui couvre l'infection durant tout le cycle parasitaire : utilisé en industrie aviaire contre la coccidiose, maladie parasitaire ayant comme agent le protozoaire intracellulaire obligatoire *Eimeria* (Shirley *et al.*, 2005).
- une vaccination couplée à une antibiothérapie : c'est le cas des infections par les hématoprotazoaires tels que *Theileria parva*, *Theileria annulata*. Ainsi, il a été démontré chez les bovins atteints de theileriose, que l'utilisation d'une primovaccination avec une souche sauvage suivie d'une prise de tétracycline à effet prolongé, constitue une stratégie de contrôle vis-à-vis de cette parasitose (McKeever *et al.*, 1999 ; Graham *et al.*, 2006).

- la vaccination à base de parasites dont le cycle vital est « tronqué ». L'exemple est celui de *Toxoplasma gondii* commercialisée en tant que vaccin administré au brebis avant l'accouplement pour les immuniser contre la toxoplasmose (Buxton *et al.*, 1995)
- la vaccination utilisant des souches virulentes atténuées. C'est le cas de *Babesia bovis* et *Babesia bigemina* agents responsables de la babésiose chez les bovins et dont un vaccin commercialisé a fait ses preuves sur le terrain. Il participe à l'atténuation de l'infection chez les jeunes animaux (De Waal *et al.*, 2006). Pour la piroplasmose chez le veau, un vaccin atténué a été développé (Ojeda *et al.*, 2010).

## II.2. Les vaccins inertes :

Cinq types de vaccins inertes seront cités ici :

La production de vaccins inertes fait appel dans sa conception finale à la réalisation d'une étape d'inactivation du pathogène grâce à un traitement chimique (formol,  $\beta$  propiolactone éthylène imine,...) ou physique (chaleur, rayonnement UV,...). Ces traitements assurent une bonne stabilité et innocuité du vaccin inactivé mais peuvent altérer l'immunogénicité des protéines (Duque *et al.*, 1989). Afin d'obtenir une réponse immune satisfaisante, ces vaccins doivent contenir une quantité importante de l'agent pathogène inactivé et nécessitent fréquemment la présence d'adjuvants et l'injection de plusieurs doses pour induire une protection durable, ce qui explique leur coût de production assez élevé. Plusieurs vaccins de ce type sont actuellement commercialisés :

### 1-Les vaccins entiers inactivés:

Un certain nombre de vaccins viraux à visée humaine ont été produits ainsi : le vaccin pour lutter contre la grippe aussi contre l'hépatite A (Havrix<sup>R</sup> par GlaxoSmithkine, AVAXIM<sup>R</sup> par Sanofi Pasteur MSD). La plupart des vaccins bactériens de première génération sont constitués de bactéries entières inactivées: *Salmonella typhi* pour la typhoïde, *Vibrio cholerae* pour le choléra, *Bordetella pertussis* pour la coqueluche.

### 2- Les vaccins constitués de toxines inactivées :

On cite comme exemple pour l'homme, les vaccins contre la diphtérie et le tétanos (Gaston Ramon, Institut Pasteur (1923)), qui sont composés de protéines sécrétées par les bactéries elles mêmes qui sont purifiées et traitées chimiquement. En effet, la présence d'anatoxines peut stimuler le système immunitaire et les anticorps produits contre elles peuvent neutraliser l'activité des réelles toxines bactériennes induisant une protection chez l'homme.

### 3- Les vaccins sous-unitaires :

Ils sont composés de protéines purifiées ou recombinantes immunogènes issues de l'agent pathogène. Bien souvent, les protéines immunogènes choisies pour ce type de vaccins sont les protéines de surface exposées naturellement au système immunitaire. Deux exemples probants sont le vaccin protégeant le chat contre l'herpès virus félin et le vaccin protégeant contre le virus de l'hépatite B chez l'homme par administration des protéines d'enveloppe virale produites en système de levures ou sur lignées cellulaires (Stephenne *et al.*, 1988). Les vaccins à base de pseudoparticules virales (Virus Like Particles -VLPs) peuvent être considérés comme des vaccins sous-unitaires. Le très récent vaccin contre les papillomavirus Gardasil<sup>R</sup> protégeant contre les sérotypes 6, 11, 16, 18 est utilisé pour prévenir des cancers du col de l'utérus (Siddiqui *et al.*, 2006). Des candidats vaccinaux basés sur les VLPs ont été également développés contre le virus H1N1 (Quan *et al.*, 2010), le virus de la bluetongue (Roy *et al.*, 1990 ; Roy *et al.*, 1994 ; Stewart *et al.*, 2010) et le virus de la fièvre de la vallée du Rift ( Liu *et al.* 2008 ; Mandell *et al.*, 2010 ; De Boer *et al.*, 2010) induisant une réponse immunitaire protectrice, ils sont très prometteurs. La stabilité de la production de ces VLPs ainsi que le coût de production restent des facteurs limitant pour l'utilisation de ces vaccins à grande échelle dans le monde animal. Quelques vaccins à base de particules VRP (Virus-like Replicon Particles) produites par le système de réplication basé sur le vecteur alphavirus ont également été produits. Un vaccin exprimant le gène de l'hémagglutinine (HA) ou de la neuraminidase (NA) du virus influenza H3N2 (Hubby *et al.*, 2007) ou celui des glycoprotéines du virus de la fièvre de la vallée du Rift (Gorchakov *et al.*, 2007 ; Heise *et al.*, 2009) semblent induire une immunité protectrice.

### 4- Les vaccins peptidiques :

Ne sont inclus dans ces vaccins que les peptides ou les épitopes reconnus dans le cadre de la réponse immunitaire acquise par les lymphocytes B ou T. De manière à obtenir une immunogénicité correcte, ces peptides doivent le plus souvent être couplés à une protéine porteuse comme l'ovalbumine et être adjuvés. De tels peptides ont été définis et ont pu être

utilisés avec succès pour protéger les chiens contre la parvovirose canine (Langeveld *et al.*, 1994). Néanmoins cette approche, en terme de production industrielle génère un coût de production assez élevé et une technologie complexe à mettre en place. Une très bonne innocuité est assurée par les vaccins dits peptidiques et les vaccins sous-unitaires.

#### 5- Les vaccins à ADN nu :

Les progrès des biotechnologies ont permis le développement de vaccins à ADN nu, dans lesquels le gène codant pour une protéine immunogène d'un pathogène est exprimé par un plasmide se répliquant dans le système bactérien ceci sous le contrôle d'un promoteur eucaryote pour une expression optimale dans les cellules de l'espèce de l'hôte cible. Néanmoins, ce type de vaccin soulève un problème potentiel de sécurité suite au risque d'intégration de l'ADN vaccin dans le génome cellulaire (Rosenberg *et al.*, 2003). Par contre, par rapport aux avantages des vecteurs vivants atténués non réplicatifs, la technologie du vaccin plasmidique ajoute une série d'améliorations complémentaires, à savoir :

- L'absence d'immunité contre le vecteur lui-même, ce qui réduit les risques d'interférence lors d'administrations répétées du même vecteur
- L'expression prolongée de l'antigène recombinant qui explique en partie, une longue persistance des réponses immunitaires.
- L'absence de compétition entre le transgène et le vecteur pour l'activation des réponses immunitaires permettant une réponse ciblée et spécifique de l'antigène vaccinal
- Dans certains cas, ce modèle permet l'activation des réponses cellulaires par des séquences immunostimulatrices (CpG) localisées dans le plasmide lui-même (Hong *et al.*, 2004).

Enfin, la possibilité de vacciner de très jeunes animaux, même en présence d'une forte immunité maternelle due à la présence des anticorps maternels résiduels, avec un vaccin à ADN, a été démontrée dans plusieurs espèces d'intérêt vétérinaire (Fischer *et al.*, 2003). Ainsi cette approche à base d'ADN nu permet d'engendrer une très bonne réponse immunitaire pour la lutte contre le pathogène lorsque l'immunité maternelle a fortement chuté et que l'immunité active n'a pas pu être efficacement stimulée par un vaccin classique.

Les vaccins vivants vectorisés par des vecteurs d'origine virale représentent un bon compromis entre les vaccins vivants atténués et les vaccins inertes. Ils présentent l'antigène de façon adéquate au système immunitaire, sans poser les problèmes de réversion vers la

pathogénicité qui peuvent être redoutés avec les vaccins vivants atténués. Un nombre certain d'études expérimentales avec les différents systèmes vectorisés disponibles démontrent l'efficacité de nombreux vecteurs viraux. Les alphavirus ont été testés dans le cadre de la vaccination contre la malaria (Tsuji *et al.*, 1998) et la FVR (Heise *et al.*, 2009) chez la souris. D'autres replicons basés sur le virus de l'encéphalite équine Venezuelienne (VEE), le Semliki Forest virus (SFV) et le Sindbis virus (SIN), sont très prometteurs en tant que candidats vaccinaux contre les fièvres hémorragiques de Lassa et Marburg (Hevey *et al.*, 1998 ; Pushko *et al.*, 2001). Les orthomyxovirus (influenza virus type A) peuvent susciter une réponse immunitaire contre une protéine non structurale du virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) (Ferko *et al.*, 2001). Les virus associés à l'adénovirus (AAV) se sont montrés efficaces dans l'induction d'une réponse protectrice contre le HIV-1 également (Xin *et al.*, 2002). Les adénovirus semblent également être des vecteurs vaccinaux intéressants contre le HIV-1 (Shiver *et al.*, 2002) ou contre le virus Ebola (Sullivan *et al.*, 2000). Enfin, les poxvirus sont de très bons candidats vaccinaux pour protéger de la rougeole chez le macaque (Stittelaar *et al.*, 2000). Malgré ces nombreuses études expérimentales en médecine humaine préventive, il n'existe pas aujourd'hui de vaccin humain commercialisé basé sur l'utilisation de vecteurs viraux. En médecine vétérinaire, un petit nombre de vaccins vectorisés sont aujourd'hui commercialisés, dans le cadre de la lutte contre la rage en Europe. Dans ce but, le virus de la vaccine porteur du gène de la glycoprotéine G du virus rabique s'est montré protecteur chez le renard avec une administration par voie orale. Il a permis d'éliminer les réservoirs sauvages du virus de la rage dans de vastes zones européennes (Mackowiak *et al.*, 1999). D'autre part, le vecteur canarypoxvirus non répliquatif chez les mammifères a été utilisé comme vecteur d'expression de protéines immunogènes du rétrovirus responsable de la leucose féline (Taylor *et al.*, 1995 ; Tartaglia *et al.*, 1993), des protéines VP2 et VP5 du virus de la bluetongue (Boone *et al.*, 2007), des protéines immunogènes prM/E du virus West Nile (Minke *et al.*, 2004a) et de la protéine H du virus aviaire H5N1 (Kyriakis *et al.*, 2009).

Les vaccins vivants vectorisés par des vecteurs d'origine bactérienne ne seront pas présentés ici de façon exhaustive. Ainsi, plusieurs espèces appartenant à différentes familles de bactéries peuvent être utilisées comme vectrices telles que *Salmonella* pour lutter contre *Streptococcus pneumoniae* chez les enfants (Curtiss *et al.*, 2010), *Listeria* dans les thérapies anti-cancéreuses (Tangney *et al.*, 2010), les colibacilles tels que *E. coli* pour lutter contre *Vibrio cholerae* (Keller *et al.*, 2010) et bien d'autres.

## **Chapitre 2 : Les différents vecteurs utilisés en vaccinologie**

Les vaccins à virus recombinants constituent les nouveaux outils prometteurs pour véhiculer des antigènes au sein d'un organisme. Ce type de présentation de l'antigène reproduit le schéma naturel de l'infection virale, avec une activation efficace de la réponse cellulaire (Damas-Rocha *et al.*, 2004).

L'obtention de vaccins recombinants est basée essentiellement sur l'incorporation du transgène dans le vecteur, ils sont considérés comme d'excellents immunogènes par leur facilité de pénétration dans les cellules, en particulier dans les cellules CPA en déclenchant efficacement et précocement toute la cascade de la réponse immunitaire cellulaire (Brown *et al.*, 2003 ; Miyazawa *et al.*, 1999). Les grands avantages de ces vecteurs recombinants sont leur conservation par lyophilisation tout en conservant leur pouvoir immunogène ainsi que l'induction d'une protection par l'administration d'une dose unique pour protéger contre certains agents pathogènes (Damas-Rocha *et al.*, 2004).

Bien que tout génome viral puisse être manipulé, tous les virus n'ont pas les mêmes capacités à pouvoir exprimer des gènes étrangers dans les cellules hôtes. Certains virus ont été identifiés comme étant plus efficaces pour l'induction d'une réponse immunitaire. Parmi ceux-ci, les virus influenza, les poxvirus, les adénovirus, (Damas-Rocha *et al.*, 2004), le rubella virus (Pugatchev *et al.*, 2000) et les flavivirus (Brandler *et al.*, 2008) représentent les vecteurs les plus attractifs qui peuvent être utilisés à des fins de vaccination mais aussi en thérapie génique.

Dans les 2 premières parties (I et II) de ce chapitre 2, seront décrites les caractéristiques et les particularités de ces vecteurs, leur modèle de construction, leurs avantages et limites, ainsi que des exemples de leurs applications. L'exemple du vecteur capripox Kenya Sheeppoxvirus I (KS1) et son expression vis-à-vis de deux transgènes : le gène H du virus de la PPR, et le gène NSmG2G1 pour le virus de la FVR sera ensuite détaillé.



## **I. Les vaccins recombinants vectorisés par des virus ARN**

### **I.1. Les virus Influenza en tant que vecteurs :**

Les virus influenza A sont des virus à ARN enveloppés appartenant à la famille des Orthomyxoviridae. Leur génome est constitué de 5 segments monocistroniques et 3 bicistroniques. Ces virus possèdent plusieurs particularités qui les classent en tant que bons candidats pour l'expression de transgènes (García-Sastre *et al.*, 2000) : ils ont l'avantage de ne pas s'incorporer dans le génome cellulaire même sur de longues périodes d'infection ce qui limite le risque lié à l'oncogenèse. D'autre part, l'existence de plusieurs sérotypes et variants et souches virales permet d'éviter les inconvénients liés à l'existence possible d'une pré-immunité liée au vecteur en sélectionnant les meilleurs vecteurs d'expression (Jin *et al.*, 2003 ; Mendelman *et al.*, 2001).

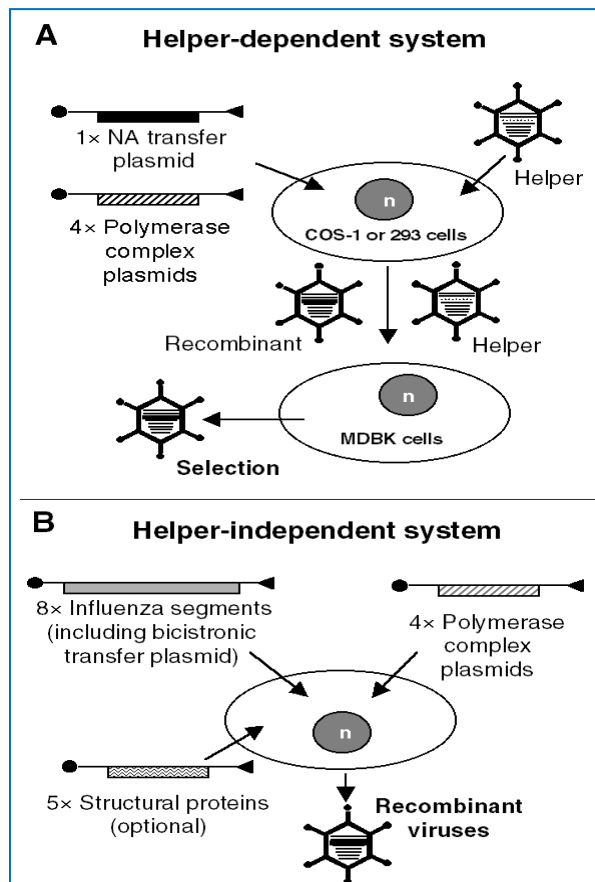
#### La construction d'un virus Influenza recombinant :

Suite au développement de la génétique inverse, deux systèmes de construction des virus Influenza recombinants ont été élaborés : le système « helper-dependent » et le système « helper-independent » tels que décrits sur la Figure 3 (Neumann *et al.*, 2002). Dans le cas du système « helper-dependent », la construction repose sur la cotransfection de 5 plasmides, un premier plasmide contenant le segment bicistronique recombinant et 4 autres plasmides comportant la protéine de fusion ainsi que 4 protéines structurales pour stimuler la formation des recombinants. Cette méthode nécessite des cellules permissives pour la sélection des recombinants. Dans le cas du système « helper-independent », une cotransfection de 17 plasmides dont l'un renferme le segment bicistronique recombinant permet d'assurer toute la machinerie virale. Les virions néoformés constituent les vecteurs recombinants. Ces deux systèmes ont pu générer des virus recombinants.

#### **Limites :**

La capacité d'insertion transgénique dans ces virus est limitée. Elle varie entre 12 aa et 28aa, ce qui est très faible. Pour pouvoir exprimer de longs fragments génomiques, plusieurs options sont possibles : l'insertion de séquences IRES (Internal Ribosome Entry Site) , séparateurs de séquences codantes favorisant l'augmentation de la taille de l'insert (García-Sastre *et al.*, 1994) ; une seconde option est un agencement différent de segments bicistroniques permettant l'insertion de transgènes d'une taille de 220aa. Ce type de

recombinant a prouvé sa stabilité *in vitro* et *in vivo* en multiplication dans les poumons des souris (Machado *et al.*, 2003).



**Figure 3 :** le système « helper-dependent » et le système « helper-independent » des virus Influenza

#### Exemples de vaccins Influenza recombinants :

Le premier vecteur construit à partir du virus Influenza a permis d'exprimer la protéine du circumsporozoïte du parasite *Plasmodium* connu pour sa reconnaissance par les lymphocytes T CD8+. L'immunisation de souris avec ce vecteur Influenza recombinant en tant que primo-immunisation « prime » suivie par un virus recombinant à base du virus de la vaccine en tant que stimulant « boost » aboutit à la protection des animaux (Li *et al.*, 1993 ; Miyahira *et al.*, 1998). L'épitope V3 de la protéine d'enveloppe env du virus VIH a également pu être exprimé par ce modèle vectoriel et en combinaison avec un virus recombinant à base du virus de la vaccine induisent en synergie une réponse cellulaire de type CD8 (Gonzalo *et al.*, 1999). L'expression d'un épitope du virus de la lymphochorioméningite reconnu par les cellules T (Castrucci *et al.*, 1994) ainsi que l'expression d'un épitope du virus Herpes Simplex

Virus 2 (HSV-2) reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques (Blaney *et al.*, 1998) confèrent une immunité protectrice.

En conclusion, au vu des quelques exemples déjà développés, les virus Influenza recombinants confèrent une immunité stable et de longue durée suite à une primo-immunisation (Castrucci *et al.*, 1994 ; Blaney *et al.*, 1998) cependant cette réponse ne permet pas, dans certains cas, l'induction d'une immunité protectrice, elle demande à être stimulée par d'autres types de vecteurs vivants, tels que le virus de la vaccine (Li *et al.*, 1993 ; Miyahira *et al.*, 1998).

## I.2. Les virus Rubella en tant que vecteurs :

Le rubella virus (RUB) est un petit virus ARN de 10 kb et de polarité positive appartenant au genre Rubivirus et à la famille des Togaviridae. Le RUB a montré son efficacité vaccinale en tant que souche vaccinale atténuée depuis les années 1970 pour protéger contre la rubéole. La réponse immunitaire engendrée suite à une vaccination a toujours montré des résultats supérieurs à 95% dans la majorité des cas (Pugatchev *et al.*, 2000). En tant que vecteur recombinant, le RUB présente certaines limites similaires à celles des virus Influenza, notamment la taille de l'insert pour en faire un bon candidat vaccinal hybride. La limitation dans la taille de l'insert ainsi que la stabilité du virus RUB sont les principales difficultés (Spadicini *et al.*, 2010). L'amélioration de la stabilité du vecteur a pu être résolue par l'introduction de séquences IRES du picornavirus au sein du génome du virus rubella, stratégie déjà utilisée pour assurer la stabilité des vecteurs alphavirus (Schlesinger *et al.*, 1999). Concernant la taille de l'insert, la délétion d'une protéine non structurale P150 appartenant au génome du virus rubella a permis l'insertion de plus gros transgènes ainsi que leur expression *in vitro*. Ces premiers résultats ont pu mettre en évidence la capacité du virus rubella à intégrer dans son génome des gènes de taille supérieure à la taille du virus rubella avec une répllication stable dans un système *in vitro* (Spadicini *et al.*, 2010).

En conclusion, le gros avantage du vecteur rubella virus est sa capacité de répllication à une croissance exponentielle au sein de son hôte. Cette particularité permet la production d'antigène en continu ce qui assure le potentiel de la réponse immunitaire innée. Par contre, la présence d'anticorps dirigés contre le vecteur acquis lors de vaccination limite son utilisation en dose unique (Robert-Guroff *et al.*, 2007).

### I.3. Le virus de la rougeole en tant que vecteur :

Le vaccin contre la rougeole est l'un des meilleurs vaccins humains. C'est un morbillivirus enveloppé avec un génome à ARN non segmenté de 16kb (Brandler *et al.*, 2008). Suite à une première infection par ce virus, une réponse immunitaire forte et spécifique est établie. Elle protégera l'individu tout le long de sa vie. La réponse est humorale mais aussi cellulaire par la prolifération de TCD8+. L'atténuation de plusieurs souches du virus de la rougeole a conduit à la sélection d'entités virales résultant de plusieurs combinaisons de mutations assurant l'absence de la pathogénicité et l'irréversibilité au phénotype sauvage (Hilleman *et al.*, 2002).

Les réflexions qui ont conduit à la conception de recombinant à partir du virus de la rougeole sont multiples. Ils reposent tout d'abord sur la stabilité de ce virus et sa facilité de production. Leur mode de répllication est strictement intra cytoplasmique d'où l'absence de risque d'intégration au génome cellulaire. De plus, ces virus ont une grande affinité pour les cellules du système immunitaire et, en particulier, les CPA, intérêts majeurs pour les vecteurs vaccinaux.

Un vecteur dérivé de la souche vivante atténuée Schwarz du virus de la rougeole (VR) a été développé . La capacité de ce vecteur à exprimer fortement et stablement des glycoprotéines d'enveloppe du VIH et les protéines de surface du virus de l'hépatite B et à induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques *in vivo*, a été démontré (Lorin *et al.*, 2004 ; Del Valle *et al.*, 2007).

Egalement, ce vecteur a pu surmonter une immunité préexistante contre la rougeole, au moins chez l'animal, quand deux doses de vaccins recombinants ont été administrées (Zhu *et al.*, 2000). Des essais cliniques sont en cours pour confirmer cette observation chez des adultes préimmunisés. Des candidats vaccins recombinants construits à partir du virus de la rougeole exprimant des protéines du virus du Nil occidental ont également été produits (Despres *et al.*, 2005) avec une protection totale contre une épreuve expérimentale. D'autres candidats vaccinaux recombinants pour les 4 sérotypes de la dengue ont été construits, ce type de vecteur pourrait être utilisé comme vaccin combiné pour immuniser des enfants et des adolescents simultanément contre la rougeole et les flaviviroses comme la dengue dans les pays en développement (Brandler *et al.*, 2008 ; Brandler *et al.*, 2010).

#### I.4. Exemple d'autres vecteurs : le virus Newcastle

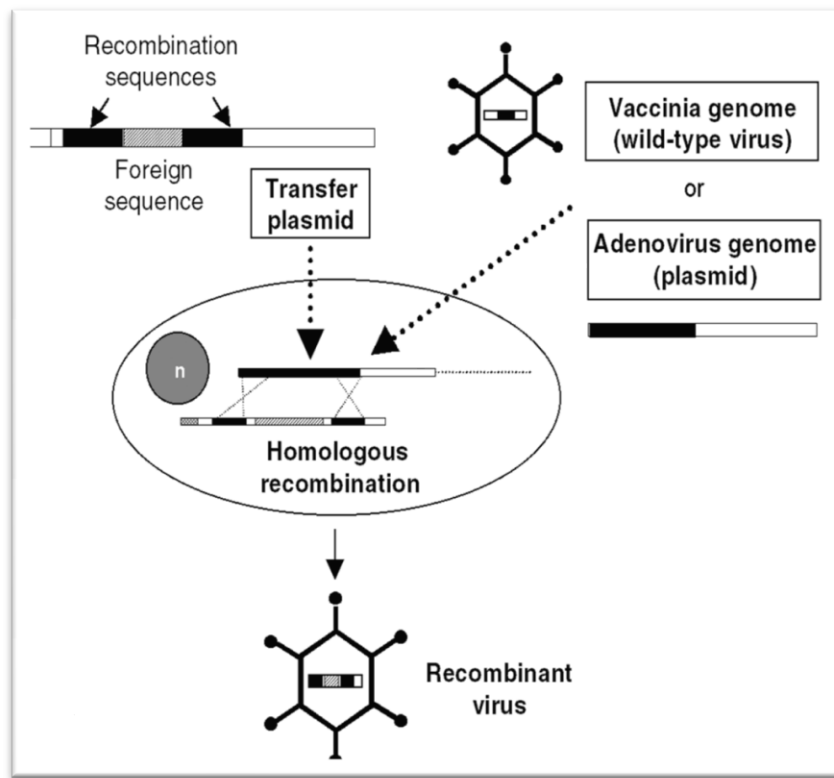
Le virus Newcastle est un paramyxovirus d'origine aviaire composé d'un génome à ARN. Il n'a aucune antigénicité commune avec les virus d'origine humaine, ce qui en fait un vecteur intéressant pour l'homme qui ne développera aucune immunité anti-hôte. Un certain nombre de constructions vaccinales ont été élaborées, notamment des constructions avec l'hémagglutinine H ou Neuraminidase N du virus H5N1 induisant une immunité protectrice (DiNapoli *et al.*, 2010). Le virus respiratoire syncytial (McGinnes *et al.*, 2011) et le virus de la fièvre de la vallée du rift (Kortekaas *et al.*, 2010a ; 2010b) ont également fait l'objet de la construction de candidats vaccinaux induisant une protection lors d'infections expérimentales.

## **II. Les vaccins recombinants vectorisés par des virus à ADN**

### **II.1. Les vecteurs recombinants Adénovirus**

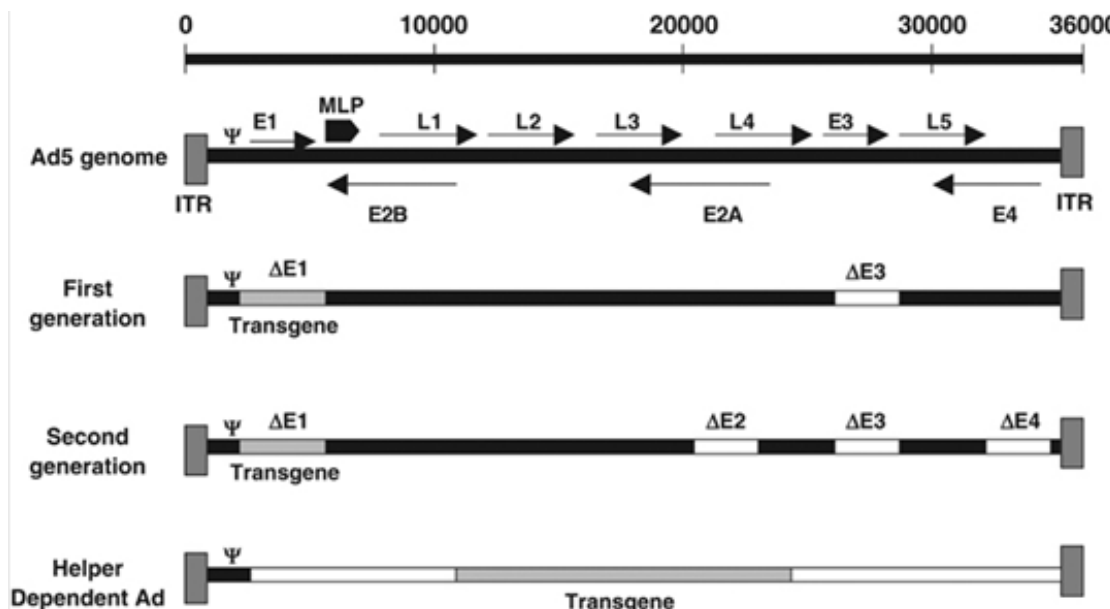
La famille des Adénovirus est divisée en deux genres, les Aviadénovirus et les Mastadénovirus, ces derniers étant capables d'infecter les mammifères. On dénombre 49 sérotypes d'adénovirus qui sont immunologiquement distincts et pouvant infecter l'homme. Certains d'entre eux (AdHu1, 2, 5, 6) restent endémiques dans des régions, d'autres sont utilisés à des fins vaccinales (Howell *et al.*, 1998). Les adénovirus sont des virus à ADN non enveloppés et de taille moyenne (70-100nm). Leur génome de 30 à 42kb est linéaire, bicaténaire et ne peut s'intégrer dans celui de la cellule hôte. Ces virus sont capables de se multiplier à la fois dans des cellules en division et au repos. Leur tropisme cellulaire est très varié et est conditionné par la présence de plusieurs types de récepteurs cellulaires : CAR, CD46, CD80 qui sont à l'origine de leur diversité en terme de permissivité cellulaire (Bergelson *et al.*, 1997 ; Gaggar *et al.*, 2003 ; Short *et al.*, 2004). Les adénovirus sont fortement immunogènes et ont la particularité d'activer l'immunité innée. Le complexe PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) est à l'origine de la maturation des cellules dendritiques en cellules CPA (Medzhitov *et al.*, 2000).

Le processus de recombinaison homologue effectué soit dans des cellules de mammifères ou dans des bactéries, permet d'obtenir les vecteurs adénovirus recombinants (Figure 4) (He *et al.*, 1998 ; McGrory *et al.*, 1988). La purification des particules recombinantes est réalisée sur des lignées cellulaires permissives palliant la fonction des gènes délétés.



**Figure 4 :** Construction d'un adénovirus recombinant par recombinaison homologue

A partir des années 1980, différentes méthodologies ont été initiées pour conduire à la génération des premiers recombinants adénovirus. L'AdHu5 a servi d'outil de base. Des recombinants de 1ère, de 2ème et de 3ème génération ont été élaborés (Figure 5) (Alba *et al.*, 2005).



**Figure 5 :** Représentation schématique du génome de l'AdHu5 et les différentes générations des vecteurs adénovirus

Les vecteurs de première génération (Génération 1) se caractérisent par deux délétions géniques : E1 intervient dans la réplication virale. E3 réduit l'expression des déterminants du système d'histocompatibilité majeur de classe I. La multiplication de ces vecteurs nécessite des cellules qui expriment E1. Les vecteurs de seconde génération (Génération 2) combinent une délétion totale de tous les gènes précoces. Cette nouvelle présentation permet d'augmenter la taille des transgènes à insérer, jusqu'à 14kb ; par contre ces vecteurs ne confèrent pas une immunité *in vivo* et présentent une grande toxicité. Enfin, l'adénovirus Helper dépendant appelé aussi « Gutless Adénovirus » est dépourvu entièrement de ses régions codantes.

#### Exemples de vaccins recombinants adénovirus :

Les premiers recombinants ont été utilisés pour protéger contre le virus de la rougeole, de la rage, de la stomatite vésiculeuse, du virus de l'hépatite B et celui de HIV. Dans toutes ces constructions, l'expression des transgènes a été sous le contrôle d'un promoteur eucaryote de cytomégalovirus (Alkhatib *et al.*, 1988 ; Chanda *et al.*, 1990 ; Prevec *et al.*, 1989 ; Prevec *et al.*, 1990). Dans plusieurs cas, le vecteur adénovirus confère une immunité complète à la suite d'une seule dose vaccinale ; l'exemple a été observé contre le virus de l'herpès suite à l'expression de la glycoprotéine B (McDermott *et al.*, 1989). Cependant, la contrainte majeure dans l'utilisation de ce vecteur concerne spécifiquement l'homme. En effet, une grande majorité de la population humaine possède une immunité préexistante contre une multitude d'infections naturelles à adénovirus ce qui entrave considérablement l'immunité induite par ces vecteurs. Pour contourner ce problème, des travaux ont conduit à l'utilisation d'adénovirus spécifiques des chimpanzés, tels le cas du AdCh63 et Ad68 qui, exprimant le gène gag du virus HIV ont montré des résultats encourageants (Pinto *et al.*, 2003). Les adénovirus canins contre la rage induisent une réponse immunitaire de type humorale et cellulaire lorsqu'ils sont injectés chez des moutons (Bouet-Cararo *et al.*, 2011)

## **II.2. Les poxvirus recombinants**

Les poxvirus appartiennent à la famille des Poxviridae. Ce sont de gros virus à ADN, complexes qui se répliquent entièrement dans le cytoplasme des cellules de vertébrés et d'invertébrés. Ils ont été les premiers à jouer un rôle majeur dans le développement de la virologie, de l'immunologie et de la vaccinologie (Pastoret *et al.*, 2003). Ces virus ont fait l'objet de multiples applications dans le domaine de la recherche. Ils ont permis :

- L'expression de gènes en grande quantité (soit en insérant ces derniers dans le génome du poxvirus, soit en le plaçant en aval d'un promoteur de bactériophage (Fuerst *et al.*, 1986)),
- La réactivation du génome des virus à ARN de polarité négative, comme le virus de la rage (Schnell *et al.*, 1994),
- L'établissement de banque d'ADNc, permettant d'identifier des antigènes tumoraux (Smith *et al.*, 2001).

Néanmoins, le principal domaine d'application des poxvirus reste leur usage en tant que vecteurs vaccinaux. Le virus de la vaccine VACV (Vaccinia Virus), est le prototype de cette famille. Il a contribué à la connaissance approfondie de la biologie des virus en général et des Poxviridae en particulier (Moss *et al.*, 2001). A partir des années 1980, le VACV a donné naissance au premier recombinant contre le virus de la rage (Blancou *et al.*, 1986). Les poxvirus sont passées alors de pathogènes aux premiers vaccins recombinants. Dans le genre avipoxvirus infectant strictement les oiseaux, un certain nombre de virus tels que le fowlpoxvirus, le canarypoxvirus et le pigeonpoxvirus ont prouvé leur efficacité vectorielle pour de nombreux transgènes.

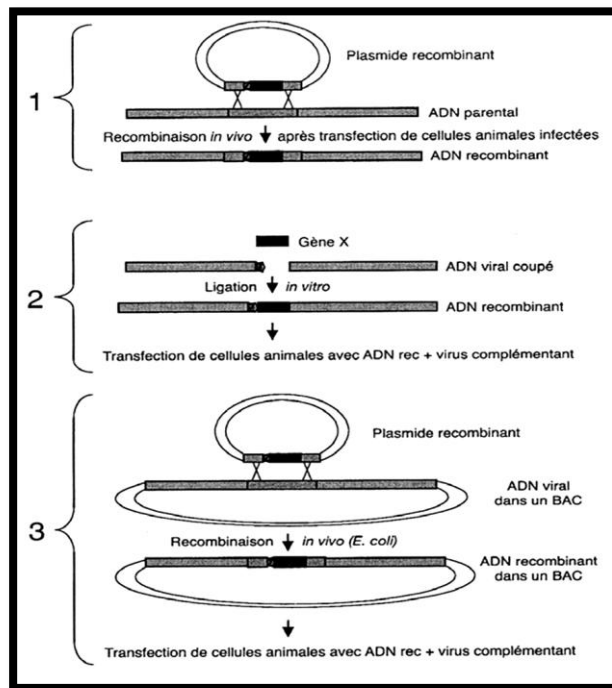
### **Construction d'un poxvirus recombinant :**

Les trois méthodes de construction disponibles sont schématisées sur la figure suivante (Figure 6).

- La première méthode : elle est basée sur le principe de la recombinaison homologue nécessitant une cassette plasmidique comportant le transgène et un gène de sélection, chacun étant sous la dépendance d'un promoteur. L'ensemble est réparti de part et d'autre de deux séquences du site d'insertion du poxvirus recombinant (la thymidine kinase, TK, par exemple). La transfection de cellules permissives préalablement infectées avec le



poxvirus avec la cassette plasmidique (ou plasmide navette) permet de générer des recombinants par recombinaison homologue *in vivo* entre l'ADN du génome du poxvirus parental et l'ADN plasmidique, pour permettre la formation d'un virus recombinant. Suite à cette recombinaison, on doit s'assurer de la stabilité du virus recombinant.



**Figure 6 :** Présentation des trois méthodes de construction de poxvirus recombinants. (Drillien *et al.*, 2003)

- La deuxième méthode : elle consiste en une ligation *in vitro* entre l'ADN poxviral digéré en un site de restriction unique et le gène à introduire comportant à ses deux extrémités le site de restriction compatible. Afin d'obtenir l'ADN recombinant, ce dernier, après l'étape de ligation est transfecté dans des cellules infectées par un autre poxvirus (virus complémentant), qui apporte l'ensemble des enzymes nécessaires à la formation du nouveau virus à partir de l'ADN recombinant. Cette méthode n'a été appliquée qu'au virus de la vaccine et les virus complémentant étaient soit une souche thermosensible du virus de la vaccine (Merchinsky & Moss, 1992), soit le virus de la variole aviaire (Merchinsky *et al.*, 1997 ; Scheiflinger *et al.*, 1992). Ce dernier présente le double intérêt d'avoir un génome assez éloigné de celui de la vaccine, ce qui limite les possibilités de recombinaison et de ne pas se multiplier sur les cellules de mammifères ce qui facilite la sélection des recombinants.

- La troisième méthode : elle est fondée sur la possibilité de cloner la totalité du génome viral dans un chromosome bactérien artificiel (BAC) et de récupérer le virus à partir du clone génomique.

Le choix du site d'insertion est un élément important dans l'élaboration des poxvirus recombinants. Le génome du genre *Capripoxvirus* a largement été étudié (Tulman *et al.*, 2001 ; Tulman *et al.*, 2002) et plusieurs régions génomiques codant pour des protéines intervenant dans le pouvoir pathogène du virus (gènes de spectre, d'hôte, gènes codant pour des protéines, qui modulent la réponse immunitaire,...), ou de régions intergéniques ne perturbant pas les propriétés du vecteur peuvent être utilisées comme sites d'insertion. Le génome des poxvirus possède une plasticité suffisamment importante pour pouvoir insérer plusieurs gènes dans le même virus. Le meilleur exemple est l'insertion de sept gènes différents de *Plasmodium falciparum* dans le virus de la vaccine ; l'intérêt est d'induire une réponse immunitaire plus large contre ce parasite (Tine *et al.*, 1996).

L'isolement du poxvirus recombinant est le plus fréquemment basé sur l'ajout d'un gène marqueur négatif conférant une résistance au virus généré (résistance à l'acide mycophénolique, à la généticine par exemple). Des gènes marqueurs positifs peuvent également être insérés et permettront la visualisation des plages de lyse grâce à la transformation d'un substrat chromogène ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase). De nombreux autres gènes marqueurs existent, mais les milieux qui permettent de les sélectionner sont bien souvent toxiques pour les cellules sur lesquelles se répliquent le virus. Depuis 1982, une sélection des virus recombinants par hybridation des plages de lyse a été développée (Panicali & Paoletti, 1982). Egalement la mise en pratique de tests utilisant des anticorps spécifiques, ont permis de mettre en évidence les virus recombinants exprimant le gène d'intérêt par une technique d'immunofluorescence indirecte.

#### Exemples d'applications de recombinants poxvirus :

Le premier vecteur qui a suscité toute l'attention des chercheurs mais aussi qui a fait preuve de résultats marquants est le virus de la vaccine. Il est capable de se multiplier aisément *in vitro* et *in vivo* au sein de tous les vertébrés. En 1982, les premiers vecteurs recombinants générés à partir du virus de la vaccine ont été élaborés en utilisant deux approches distinctes pour assurer l'innocuité de la souche virale recombinante (Mackett *et al.*, 1982 ; Panicali & Paoletti, 1982). La première approche a consisté à déléter les gènes impliqués dans la réplication virale, les interactions virus-cellules et la formation extracellulaire des virions : la

souche NYVAC qui a subi la délétion de 18 ORFs est devenue un excellent candidat vectoriel par l'induction d'une réponse immunitaire solide vis-à-vis de plusieurs transgènes (Paoletti *et al.*, 1996). La seconde approche repose sur des passages du virus de la vaccine sur des hôtes inhabituels ou sur un support cellulaire conduisant à sélectionner des variants selon les effets cytopathiques obtenus. L'exemple type de cette seconde approche est la souche Ankara (MVA) qui a subi 570 passages sur des fibroblastes d'embryons de poulets (Gallego-Gómez *et al.*, 2003). Le premier poxvirus recombinant à avoir été utilisé sur la faune sauvage est le recombinant vaccine-rage (V-RG) (Blancou *et al.*, 1986 ; Brochier *et al.*, 1989 ; Pastoret & Brochier, 1992) pour la vaccination orale des renards. Son utilisation massive dans toute l'Europe a permis une élimination progressive de la rage (Brochier *et al.*, 1991 ; Brochier *et al.*, 2001).

Un certain nombre de vaccins recombinants construits à partir de capripoxvirus ont vu le jour et protègent contre la peste bovine (Verardi *et al.*, 2002 ; Yamanouchi *et al.*, 1994), la PPR (Romero *et al.*, 1993 ; Diallo *et al.*, 2002 ; Berhé *et al.*, 2003). De même des canarypoxvirus recombinants exprimant la protéine d'enveloppe du virus HIV (Hu *et al.*, 1986), l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (Smith *et al.*, 1983) induisant une réponse immunitaire protectrice sont très prometteurs. Le développement récent d'un fowlpoxvirus exprimant le gène de l'hémagglutinine H5 du virus influenza aviaire H5N1 s'est révélé d'une grande efficacité chez des poussins éprouvés avec une souche virulente (Bublott *et al.*, 2006). La souche ALVAC du canarypoxvirus protégeant contre le virus de la West Nile a fait ses preuves dans le monde vétérinaire (Minke *et al.*, 2004a ; Karacca *et al.*, 2005).

### **Particularités et avantages des poxvirus recombinants**

De part leurs caractéristiques intrinsèques, les poxvirus présentent de nombreux avantages en tant que vecteurs viraux vaccinaux :

- la réplication étant cytoplasmique, l'introduction de gènes étrangers, ainsi que la détection et la purification des protéines produites présentent moins de difficultés que pour les virus ayant une réplication nucléaire avec une limite des risques d'intégration ou de recombinaison avec l'ADN de l'hôte, l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte est très improbable
- leur utilisation en tant que vaccins multivalents (Perkus *et al.*, 1991) avec une possibilité d'exprimer différents antigènes dans un même vecteur (Perkus *et al.*, 1985)

- l'induction d'une immunité de longue durée après une seule injection tout en induisant la réponse cellulaire et humorale contre le transgène (Zavala *et al.*, 2001 ; Andrew & Coupar, 1993, Pastoret & Vanderplasschen, 2003)
- la taille importante du génome permet d'intégrer des fragments de grande taille, ils peuvent tolérer des inserts de plus de 30 kbp (Smith *et al.*, 1984) sans influencer sur la réplication du virus
- la transcription spécifique et autonome, permet la synthèse d'ARNm, à partir de gènes étrangers, dès lors qu'ils sont sous la dépendance d'un promoteur poxviral. Les protéines issues de ces ARNm possèdent une conformation et une activité très proche de la protéine d'origine (Hruby *et al.*, 1990), ce qui n'est pas le cas avec d'autres vecteurs encore à l'étude tels que les levures
- les poxvirus sont des vecteurs largement utilisés pour la vaccination de l'homme : le virus de la vaccine par exemple est un des plus fiables et a déjà permis l'éradication mondiale de la variole, d'autres poxvirus non réplcatifs chez l'homme sont également très prometteurs (Perkus *et al.*, 1995)
- le coût de production de ce type de vaccins est faible puisque sa production se fait sur support cellulaire
- la stabilité importante (résistance à la congélation, à la lyophilisation et à la réhydratation) et la facilité d'administration (par voie intradermique, voire par voie orale) des poxvirus font de ces vecteurs des produits adaptés à la vaccination de masse
- la possibilité de développer des tests diagnostics permettant une différenciation entre animaux vaccinés et infectés (Vaccins DIVA).

### **Limites d'utilisation des poxvirus recombinants**

L'utilisation des poxvirus recombinants comme vecteurs vaccinaux possède encore quelques limites, et notamment la cytotoxicité associée à l'infection. Une solution réside en l'utilisation de poxvirus à cycle plus lent, comme les avipoxvirus. La délétion des gènes responsables de cette cytotoxicité est à l'étude, mais il est peu probable que la conversion des poxvirus en agents totalement neutres vis-à-vis de la cellule se fasse. La pathogénicité résiduelle s'avère également être un problème, du fait de son existence accrue chez les individus immunodéprimés (personnes âgées, personnes infectées par le VIH...), qui représentent une part de moins en moins négligeable de la population humaine. Cependant, la maîtrise de facteurs de pathogénicité et l'exploitation de nouvelles souches totalement apathogènes du

virus de la vaccine ou d'autres poxvirus à spectre d'hôte plus étroit devrait permettre de réduire l'impact de cet inconvénient (Hu *et al.*, 1997). Enfin, les poxvirus possèdent des gènes permettant d'inhiber partiellement la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui limite leur efficacité en tant que vecteur vaccinal. Ces quelques caractéristiques restrictives n'ont cependant qu'un faible poids à côté des nombreux avantages que présentent les poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux. Cela explique l'intérêt croissant pour cette famille dans la recherche de nouvelles approches vaccinales.

### **III- Les capripoxvirus**

Les poxvirus représentent les plus gros virus connus affectant les animaux et codant pour une moyenne de 200 gènes (Moss *et al.*, 2001). Ce sont des virus à ADN qui se répliquent entièrement dans le cytoplasme cellulaire. Le cycle viral et la formation de nouvelles particules sont strictement indépendants de la machinerie cellulaire et de ses composants. Ces virus ont la particularité de détourner la réponse immunitaire de l'hôte à leur profit par la synthèse d'immunomodulateurs viraux.

Les poxvirus infectent les vertébrés et les invertébrés ce qui est à l'origine d'une variété de pathologies d'importance vétérinaire et médicale. Ils représentent la seule famille de virus organisée en deux sous-familles, les *Chordopoxvirinae* infectant les vertébrés (Fauquet *et al.*, 2005) et les *Entomopoxvirinae* infectant les invertébrés. Les *Chordopoxvirinae* sont organisés en 8 genres (Buller & Palumbo, 1991) référencés dans le tableau 2 ci-dessous. L'homme est touché par deux poxvirus, le virus de la variole (smallpox virus) et le virus du *Molluscum contagiosum*.

#### **III. 1. Classification**

La sous famille des Chordopoxvirinae comporte 8 genres. Les membres d'un même genre sont caractérisés par une morphologie et des propriétés biologiques identiques (Moss, 1996). Les membres du genre *Orthopoxvirus* et en particulier le virus de vaccine, sont les virus les plus étudiés parmi la famille des *Poxviridae*. Le genre *Capripoxvirus*, comprend trois virus spécifiques aux ruminants : le virus de la variole du mouton (sheeppoxvirus), le virus de la variole caprine (goatpoxvirus) et le virus de la dermatose nodulaire contagieuse (le lumpy

skin disease virus) (Tableau 2). Le vecteur KS1 appartient au genre Capripoxvirus et fait partie des virus type de la dermatose nodulaire contagieuse (LSDV).

Genre	Virus types	Réservoirs
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la variole bovine (cowpox)	Bovins, Félines, Humains, Rongeurs
	Virus Ectromélie	Rongeurs
	Virus de la variole du chameau (camelpox)	Camélidés
	Virus de la variole humaine (smallpox)	Humains
	Virus de la vaccine*	Réservoir très large
<i>Parapoxvirus</i>	Virus de l'ecthyma contagieux (Orf)	Ovins, Caprins
	Virus de la paravaccine (pseudocowpox)	Bovins, Humains
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire (canarypox, fowlpox)	Oiseaux
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la variole ovine (sheeppox)	Ovins
	Virus de la variole caprine (goatpox)	Caprins
	Virus de la dermatose nodulaire contagieuse (Lumpy skin disease virus)	Bovins
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose du lapin	Lapins
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	Porcins
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus Molluscum contagiosum	Humains
<i>Yatapoxvirus</i>	Virus de la tumeur Yaba du singe	Singes, et parfois Humains
	Virus Tana	

**Tableau 2** - Classification de la sous-famille des *Chordopovirinae* - Adapté de Bertagnoli, 2003, \* Réservoir d'hôtes extrêmement large d'où son utilisation massive en tant que vecteur vaccinal.

### **III.2. Distribution géographique**

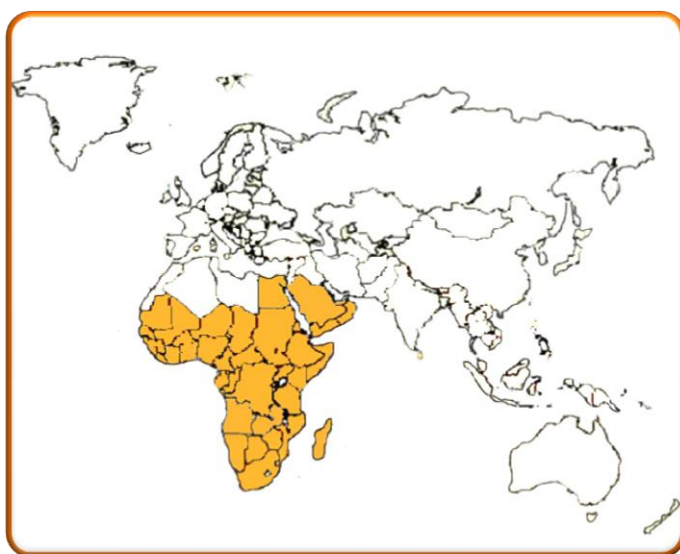
La variole ovine est signalée depuis le premier siècle après Jésus-Christ avec depuis, de nombreuses épizooties reportées aussi bien en Europe que dans le bassin méditerranéen (Fassi-Fehri & Lefèvre, 2003). La variole caprine a été décrite pour la première fois par Hansen, en Norvège en 1879 et a actuellement la même zone de répartition que la variole ovine : Afrique du Nord, Afrique subsaharienne, Asie et Moyen Orient (Figure 7) où elles sévissent généralement sous forme enzootique.

Le virus de la dermatose nodulaire contagieuse ou Lumpy skin disease virus est décrit pour la première fois par McDonald en 1929 en Zambie (Rhodésie du Nord) (McDonald *et al.*, 1931). La dermatose nodulaire est un exemple caractéristique de maladie émergente avec une extension suivie. Elle est devenue enzootique sur le continent africain jusqu'au Sud du Sahara ainsi qu'au Moyen Orient (Figure 8) (Lefèvre & Gourreau, 2003).

Seuls les bovins et les zébus présentent des signes cliniques. Cependant, au Kenya, le premier cas de dermatose nodulaire signalé a été observé sur des ovins et la souche KS1 a été ainsi isolée (Davies *et al.*, 1976). Suite aux travaux de phylogénie moléculaire concernant les capripoxvirus, la souche KS1 a été identifiée en tant que virus de la dermatose nodulaire contagieuse (Le Goff *et al.*, 2009).



**Figure 7** – Distribution géographique de la variole ovine et caprine ((Fassi-Fehri et Lefèvre, 2003)



**Figure 8** - Distribution géographique de la dermatose nodulaire contagieuse (Lefèvre & Gourreau, 2003)

### **III.3. Etiologie des capripoxvirus et notamment du KS1**

#### **III.3.1. Structure**

Les poxvirus représentent une structure complexe.

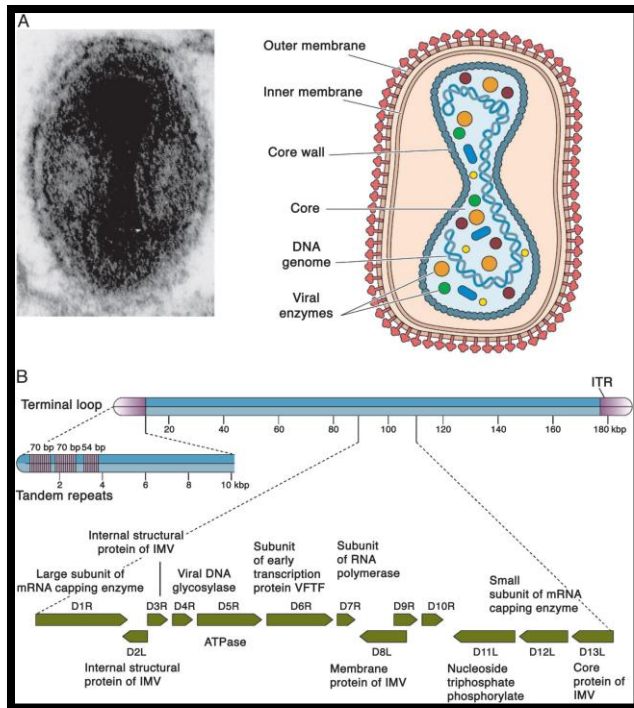
##### **Le virion :**

Les virions des poxvirus sont de grande taille discernable en microscopie optique. De forme ovoïde, ils mesurent environ entre 200 et 400 nm (Murphy *et al.*, 1999). Des cryopréparations associées à des analyses en microscopie électronique ont permis de définir la structure 3D des poxvirus (Figure 9) (Harrisona *et al.*, 2004). Ils sont formés d'un core, qui abrite le génome et les protéines virales ainsi que deux corps latéraux positionnés au niveau des deux concavités qui délimitent ce dernier. La membrane est une bicouche lipoprotéique de 5 nm d'épaisseur et de composition différente de la membrane plasmique cellulaire.

En ce qui concerne les enveloppes, leur nombre et leur nature varient en fonction de la phase du cycle viral, permettant ainsi de distinguer 4 formes de virions :

- les IMV (Intracellular Mature Virions) sont formés dans le cytoplasme et comportent une seule membrane (Cyrklaff *et al.*, 2005 ; Hollinshead *et al.*, 1999). Ils représentent la forme la plus abondante mais aussi la plus résistante (responsable de la transmission d'hôte à hôte) de la progénie virale. Ils sont libérés par la lyse cellulaire (Moss *et al.*, 2001)
- les IEV (Intracellular Envelopped Virions) sont issus des IMV, après acquisition d'une double enveloppe dérivée de l'appareil de Golgi (Schmelz *et al.*, 1994) ou des endosomes (Tooze *et al.*, 1993)
- les EEV (Extracellular Envelopped Virions) sont issus des IEV, après migration de ceux-ci à la surface cellulaire grâce au cytosquelette et perte de l'enveloppe externe par fusion avec la membrane cellulaire (Smith *et al.*, 2002). Ils permettent la diffusion chez l'hôte infecté grâce aux propriétés particulières de leur enveloppe en terme de reconnaissance de cellules cibles et de protection vis-à-vis du système immunitaire (Vanderplasschen *et al.*, 1998). Ils représentent une proportion variable (1 à 30%) de la progénie totale en fonction des souches virales et des systèmes cellulaires de culture (Blasco *et al.*, 1992 ; Blasco *et al.*, 1993). Ils sont associés à la virulence
- les CEV (Cell-associated Envelopped Virions) constituent les EEV retenus à la membrane cellulaire et responsables de la diffusion de cellule à cellule grâce à des projections cellulaires dites à queue d'actine (Blasco *et al.*, 1992)





**Figure 9** : Le virus de la vaccine. A: structure du virion ; B: organisation du génome avec une vision élargie du fragment au site de l'enzyme de restriction HindIII (Flint *et al.*, 2003)

### Le génome

Le génome des virus de la famille des *Poxviridae* est formé d'une molécule d'ADN linéaire bicaténaire, aux extrémités liées de façon covalente par des boucles terminales en épingle à cheveux (Figure 9) (Fauquet *et al.*, 2005). L'organisation générale du génome est commune à tous les poxvirus. La région centrale comporte les gènes hautement conservés, codant pour les enzymes et les protéines structurales essentielles au cycle viral. Cette région est bordée de séquences terminales inversées répétées (TIR) de 10 à 15 kb. Au niveau des séquences terminales et des régions adjacentes, on trouve des gènes non essentiels qui codent principalement pour des facteurs de virulence (Moss, 2001). La taille de l'ADN varie de 130 à 375 kb selon l'espèce virale et il est composé de 150 à 200 gènes. Le génome du KS1, quant à lui, fait 162 kpb correspondant à 171 gènes (Cameron *et al.*, 1999). Enfin, la plupart des génomes de poxvirus ont été séquencés et sont disponibles sur ce site (<http://www.poxvirus.org>).

### III.3.2. Le cycle viral

Le cycle répliatif des poxvirus, en particulier celui du KS1, a été décrypté grâce à l'étude approfondie de son prototype la vaccine (VACV). Il se déroule entièrement dans le cytoplasme de la cellule hôte et aucune intégration du génome viral dans le génome hôte n'a été rapportée jusqu'à présent. La durée totale du cycle est de 8h-12h pour le VACV, alors que pour le KS1 il est plutôt de 16h (Duteyrat *et al.*, 2006). Le cycle viral peut se décomposer en 5 étapes (Figure 10).

#### **L'entrée du virion dans la cellule :**

En fonction des observations et des formes virales (IMV ou EEV), plusieurs mécanismes d'entrée du VACV dans les cellules cibles ont été proposés (Moss *et al.*, 2001 ; Moss *et al.*, 2006 ; Roberts *et al.*, 2008). A ce jour, aucun récepteur cellulaire ni partenaire viral spécifique n'a été décrit pour illustrer la première phase de liaison du virion à la cellule. Les IMV semblent se lier à la surface cellulaire via une interaction de certaines protéines virales avec les glycosaminoglycanes (GAGS), bien que ces derniers ne semblent pas essentiels pour l'infection, et avec la laminine de la Membrane Extra Cellulaire MEC (Chung *et al.*, 1998 ; Hsiao *et al.*, 1999).

Après la liaison à la surface cellulaire, plusieurs voies d'entrée des IMV ont été proposées. L'observation de la fusion entre les membranes virales et cytoplasmiques (Carter *et al.*, 2003) ou des expériences à pH acide ( ) *et al.*, 2006) ont fait émettre l'hypothèse d'une entrée des IMV par fusion directe pour le premier cas de figure ou par endocytose pour le second. Il semblerait que les deux voies puissent être utilisées par le virus, le choix de l'une ou l'autre étant fonction de la souche virale et du type cellulaire (Townesley *et al.*, 2006 ; Bengali *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a aussi été proposé que le virion puisse perdre sa membrane avant l'entrée dans la cellule, permettant ainsi la pénétration des cores libres via des pores de la membrane plasmique (Sodeik *et al.*, 2002). Il a été démontré récemment que les virions utiliseraient, en plus, un mécanisme de macropynocytose, mimant l'apoptose pour faciliter l'entrée dans les cellules hôtes (Mercer *et al.*, 2008).

Les mécanismes d'entrée des EEV dans la cellule sont plus flous, et leur étude est rendue difficile par le faible taux d'EEV produit ainsi que par la fragilité de l'enveloppe externe des EEV. D'après une étude récente par microscopie électronique, il semblerait que cette

membrane soit rompue à l'extérieur de la cellule, avant l'entrée des IMV par un des mécanismes exposés ci-dessus (Law *et al.*, 2006).

#### **Expression des gènes précoces :**

Le cycle de multiplication des poxvirus se déroule entièrement dans le cytoplasme, ce qui implique une autonomie quant au processus de réplication et de transcription. Ainsi, l'expression des gènes se déroule de façon séquentielle au cours du cycle. Chaque événement contrôlant le suivant, et est étroitement associé à leur fonction : les gènes précoces codent essentiellement pour les protéines nécessaires à la réplication virale et à l'échappement au système immunitaire, tandis que les gènes tardifs codent pour les protéines structurales entrant dans la composition du core et/ou des enveloppes. La régulation de l'expression se fait via les séquences spécifiques de promoteurs précoces, intermédiaires et tardifs (Broyles *et al.*, 2003). Dès l'entrée du virus dans la cellule, et avant même sa décapsidation, les premiers ARNm sont transcrits. Les enzymes nécessaires (ARN polymérases et enzyme de coiffage) sont encapsidées dans le core avec le génome viral, si bien qu'aucune protéine cellulaire ne semble nécessaire pour la transcription de ces gènes précoces (Broyles *et al.*, 2003). Par la suite, les transcrits sortent du core et sont traduits par les ribosomes cellulaires. La synthèse des protéines précoces permet la décapsidation et la libération du génome.

#### **Réplication du génome viral :**

Après désintégration du core, l'ADN viral devient totalement accessible aux enzymes. Sa réplication se déroule de façon autonome dans le cytoplasme de la cellule infectée, à l'aide d'enzymes d'origine essentiellement virale. L'ADN viral ne s'associe aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) qui l'enveloppent pour former un compartiment dans lequel la réplication s'initie. Au début du cycle, la boucle de chaque télomère de l'ADN viral est coupée par une endonucléase spécifique. Les télomères poxviraux sont, par analogie aux chromosomes eucaryotes, des séquences d'ADN non codantes situées aux extrémités de la molécule linéaire d'ADN viral. C'est dans les télomères qu'ont lieu l'initiation et la terminaison de la réplication (De Lange *et al.*, 1990). Cependant, il ne semble pas exister d'origine de réplication spécifique.

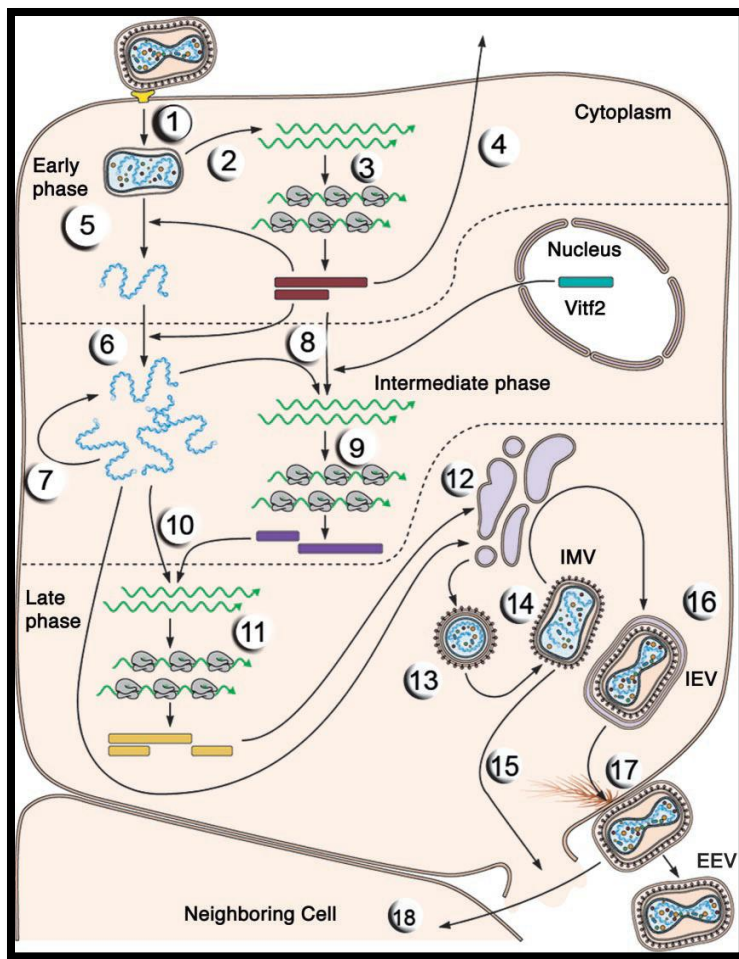
#### **Expression des gènes intermédiaires et tardifs :**

La transcription de ces gènes nécessite la synthèse *de novo* de l'ARN polymérase virale et la participation de protéines cellulaires. Le statut des gènes intermédiaires est ambigu. Il a été

proposé que cette classe n'existe pas et qu'il puisse en fait s'agir de gènes précoces, ou précoces/tardifs, ou tardifs ou bien non classés, du fait d'un profil d'expression atypique (Assarsson *et al.*, 2008). Ils ont été peu étudiés et sont majoritairement impliqués dans la régulation des gènes tardifs. Les gènes tardifs codent pour les facteurs de transcription des gènes précoces, ainsi que pour les protéines participant à la morphogenèse et à l'assemblage des virions néoformés.

### **Assemblage et relargage des virions :**

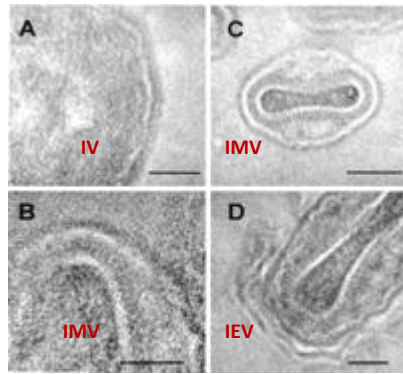
Les premières étapes de la formation des virions ont lieu dans des zones circonscrites du cytoplasme, appelées virosomes, dans lesquelles les organites cellulaires sont exclus. Les premières membranes en forme de croissant sont formées de lipides et de protéines virales et s'assemblent pour former les virions immatures (IV) (Figure 11). Leur origine (*de novo* ou issue de membrane cellulaire) et leur nombre (membrane simple ou bicouche) est encore sujet à controverse (Roberts *et al.*, 2008). Les IV s'arrondissent et deviennent matures par clivage protéolytique des protéines de capsid et par condensation du core viral, de façon à produire la première forme infectieuse de virions : les Virions Matures Intracellulaires (IMV). Pour la majorité des virions, la morphogenèse s'arrête à ce stade et les IMV sortent par lyse cellulaire. Certains IMV migrent vers les endosomes ou l'appareil de Golgi, via le système microtubulaire intracellulaire, et sont enveloppés d'une double membrane, pour devenir les Virions Intracellulaires Enveloppés : IEV. Les IEV migrent, ensuite, vers la périphérie de la cellule grâce aux microtubules (Smith *et al.*, 2002). Une fois arrivée à la membrane plasmique, l'enveloppe externe des IEV fusionne avec celle-ci pour exposer à la surface cellulaire un virion enveloppé, le CEV. Par une série de signaux transmis via les protéines virales qui se retrouvent alors ancrées dans la membrane plasmique, la polymérisation des fibres d'actine est déclenchée sous les CEV. Les queues d'actine ainsi formées apportent les CEV vers les cellules avoisinantes, permettant la diffusion du virus de cellules à cellules. Une partie des CEV est aussi libérée dans le milieu pour former des EEV qui vont disséminer à distance. L'exocytose des IEV n'est pas la seule façon de former des EEV, puisque le bourgeonnement des IMV à travers la membrane plasmique a aussi été décrit (Roberts *et al.*, 2008).



**Figure 10:** Représentation schématique du cycle de réplication des poxvirus (modèle VACV) (Flint *et al.*, 2003)

Les différentes étapes du cycle de réplication sont :

- 1 :** Attachement à la cellule, deux formes de virions infectieux peuvent initier l'infection, l'attachement à la cellule est déterminé par les GAGs ou des composants de la MEC ;
  - 2 :** Pénétration dans la cellule et libération du core dans le cytoplasme ;
  - 3 :** Transcription des gènes précoces et expression des protéines précoces ;
  - 4 :** Réplication de l'ADN ;
  - 5 :** Transcription des gènes intermédiaires ;
  - 6 :** Transcription des gènes tardifs ;
  - 7 :** Début de l'assemblage avec les premiers fragments de membranes, puis formation des virions immatures ;
  - 8 :** Maturation et formation des IMV ;
  - 9 :** Transport des IMV vers le Golgi via les microtubules et acquisition d'une double enveloppe (IEV) ;
  - 10 :** Migration des IEV vers la surface cellulaire via le cytosquelette ;
  - 11 :** Fusion avec la membrane plasmique cellulaire, formation des CEV et libération des EEV
- L'assemblage et le relargage des virions qui correspondent aux étapes 13, 14, 15, 16, 17 et 18 du cycle viral suivent le processus décrit ci-dessus (Chicho *et al.*, 2009) :



**Figure 11** : La morphogénèse du VACV  
(Tokuyasu K.T. et al., 1980)

### **III. 4. Interactions hôte-virus**

Les modalités d'interactions entre les poxvirus et leur hôte vont moduler le tropisme viral. Il est important de les connaître et de les comprendre pour optimiser l'utilisation des poxvirus en tant que vecteurs en vaccinologie et en thérapie génique. Il est possible de schématiser les interactions hôte-virus selon 3 niveaux de tropisme viral :

- Le tropisme au niveau cellulaire qui met en jeu un certain nombre de mécanismes et interactions moléculaires qui peuvent expliquer le cycle permissif, semi-permissif ou abortif d'un virus dans un type de cellule donnée.
- Le tropisme tissulaire ou organique qui est intermédiaire entre les deux autres niveaux.
- Le tropisme d'hôte qui est influencé par les deux premiers niveaux et par les réponses inflammatoires et immunitaires de l'hôte. Il va déterminer la pathogénie, la diffusion virale dans l'organisme infecté et la dissémination entre les organismes, en fonction des mécanismes élaborés par le virus pour échapper aux réponses de l'hôte (McFadden *et al.*, 2005). De nombreuses protéines virales interviennent à différents niveaux pour moduler les interactions avec l'hôte.

#### **a) Tropisme cellulaire**

##### **Particularités du tropisme cellulaire des poxvirus**

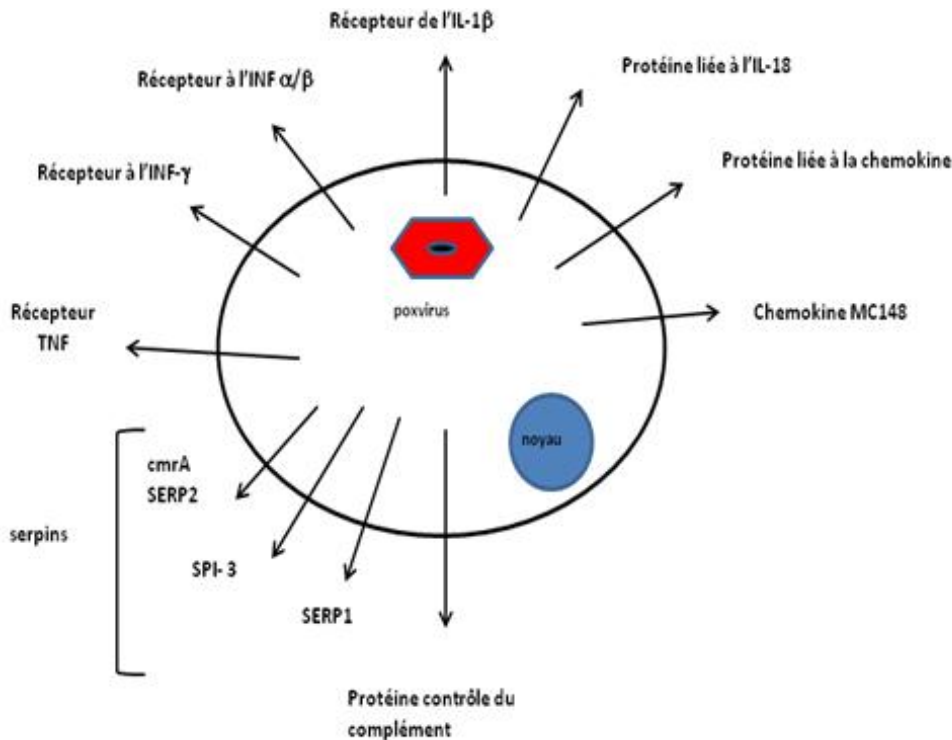
Pour beaucoup de virus, le tropisme cellulaire est largement déterminé par l'interaction entre des protéines virales exposées et leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules hôtes. Bien que des éléments semblent favoriser la permissivité de certaines cellules pour les virus (tels que la présence de rafts lipidiques (Chung *et al.*, 2005) et de polysaccharides (Moss *et al.*, 2006), ou l'expression de certains récepteurs de surface (Chahroudi *et al.*, 2005 ; Lalani *et al.*, 1999) aucun récepteur spécifique des poxvirus n'a été identifié jusqu'à présent. De façon générale, tous les déterminants cellulaires impliqués jusqu'à présent dans les phases d'attachement et d'entrée du virion dans la cellule sont des éléments de surface ubiquitaires, tels que les GAGs et les éléments de la MEC. Les poxvirus semblent donc capables d'infecter un large spectre de cellules, le blocage apparaissant dans les événements intracellulaires en aval des étapes d'attachement, d'entrée et même d'expression virale précoce (Johnston *et al.*, 2003).

### **Facteurs d'hôte**

Sur le génome des poxvirus, outre les gènes conservés essentiels à la réplication et à la morphogenèse, il existe une deuxième catégorie de gènes, non essentiels, qui influencent le profil pathologique propre à chaque espèce virale, ce sont les gènes de virulence. Parmi ces derniers, les gènes de spectre d'hôte pour lesquels la délétion entraîne une modification du tropisme cellulaire.

### **Contrôle du cycle cellulaire**

Beaucoup de poxvirus sont capables d'exprimer des facteurs de croissance, mimant l'action de leurs homologues eucaryotes, les facteurs EGF (Epidermal Growth Factor) ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Il a été mis en évidence que le facteur de croissance VGF (Vaccinia Growth Factor) du VACV, après avoir été sécrété hors de la cellule infectée est capable de stimuler la mitose et d'induire la prolifération des cellules quiescentes voisines, infectées ou non infectées (Buller *et al.*, 1988 ; Seet *et al.*, 2003). Les homologues poxviraux d'EGF sont interchangeables d'une espèce virale à l'autre, et peuvent même remplacer les fonctions biologiques de leur équivalent cellulaire (Nash *et al.*, 1999).



**Figure 12A :** Production des immunomodulateurs sécrétés par les poxvirus

Un certain nombre d'immunomodulateurs sécrétés par les poxvirus ont été décrits (Figure 12A).

### **Le facteur SERP-2 :**

La protéine SERP-2 appartient à la superfamille des serpins (SERine Proteases INhibitor) (Petit *et al.*, 1996), inhibiteurs irréversibles des serines protéases qui régulent divers processus physiologiques tels que l'apoptose, l'inflammation, l'activation du complément, la fibrinolyse ou la coagulation (Zuniga *et al.*, 2002). Sa fonction prédictive correspondait initialement à un équivalent fonctionnel de CrmA du virus cowpox qui inhibe l'enzyme ICE (Interleukine 1 $\beta$  Converting Enzyme). Mais SERP-2 semble être un faible inhibiteur et ne forme pas de complexe stable avec ICE *in vitro* (Turner *et al.*, 1999). Le rôle exact de SERP-2 dans la prévention de l'apoptose reste actuellement obscur.

### **Interférence avec les IFNs**

Plusieurs études montrent que la voie des IFNs est un élément clé dans le tropisme du KS1. En effet, Wang *et al* (Wang *et al.*, 2004) ont montré que l'infection des fibroblastes primaires murins est bloquée par la cascade de signalisation Erk-IFN-STAT1, et que l'inactivation du facteur Erk ou de la signalisation médiée par le facteur de transcription STAT-1 lève le blocage et rend les fibroblastes primaires permissifs à l'infection. Les IFNs ont d'abord été décrits comme une substance sécrétée par les cellules et induit la résistance des cellules



voisines à l'infection virale. Il existe différents types d'IFN : les IFNs de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ), qui se lient à un récepteur commun (R-IFN $\alpha/\beta$ ), et les IFNs de type II (IFN- $\gamma$ ), qui se lient à un récepteur différent (R-IFN $\gamma$ ). Les deux types d'IFNs ont une activité antivirale directe pro-inflammatoire avec une activité immunorégulatrice. En particulier, les IFN- $\gamma$  favorisent la production de cytokines pro-inflammatoires et stimulent une réponse immunitaire de type Th1 avec la production de lymphocytes T cytotoxiques (LTc), importants pour la destruction des cellules infectées. Les poxvirus ont élaboré plusieurs stratégies pour contrecarrer la réponse aux IFNs, que ce soit au niveau de la production d'IFN, de l'interaction avec le récepteur ou de la transduction du signal (Smith *et al.*, 2002).

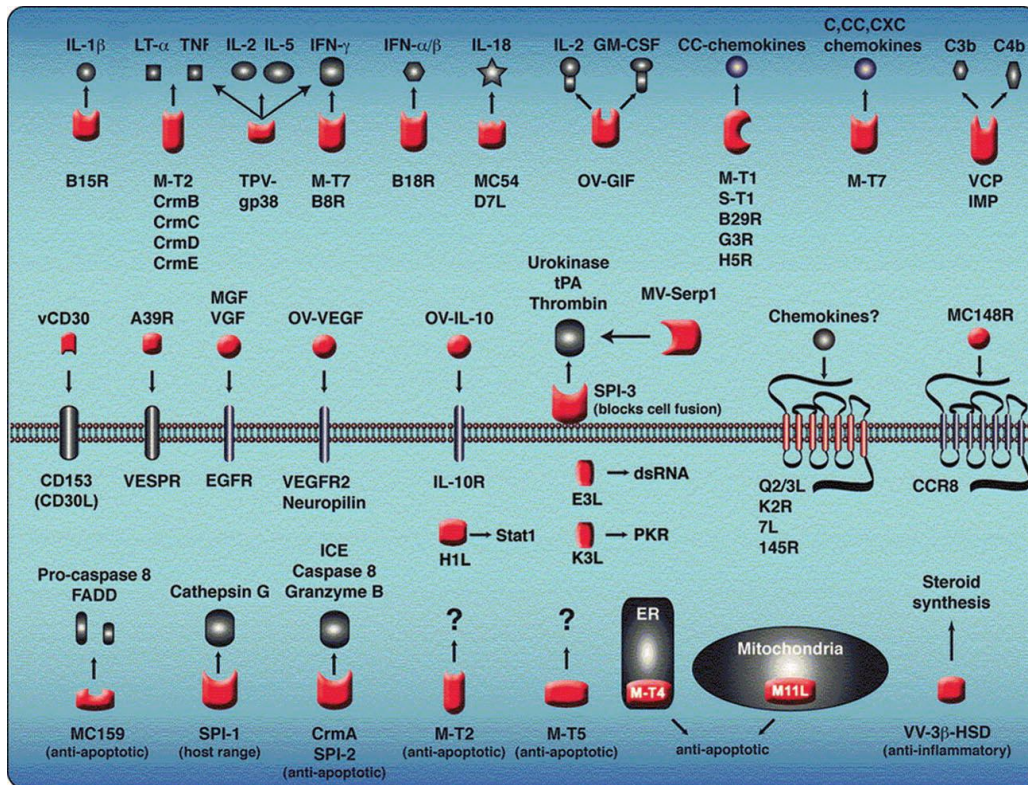
### **Contrôle de l'apoptose**

Tandis que certains virus favorisent la mort cellulaire programmée induite par l'infection virale pour en tirer avantage, tous les régulateurs poxviraux de l'apoptose connus à ce jour, sont des inhibiteurs (Everett *et al.*, 2002). Le processus apoptotique, ou processus de mort programmée, est une sorte de suicide cellulaire qui peut être induit par une grande variété de stimuli, incluant des cytokines, des hormones, des virus, des substances chimiques ou des irradiations. La voie de l'apoptose peut être induite selon deux mécanismes :

- la voie mitochondriale (ou intrinsèque) : les protéines clés sont les facteurs de la famille Bcl-2 dont l'activation résulte en la libération soudaine et complète du cytochrome c des mitochondries dans le cytoplasme, entraînant à terme l'activation des caspases, effectrices de l'apoptose.
- la voie des récepteurs de mort (ou extrinsèque) : ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor) faisant intervenir le TNF et la voie des Fas-ligand (Hengartner *et al.*, 2000). Les multiples facteurs viraux anti-apoptotiques décrits suggèrent que les poxvirus ont mis en place de nombreuses stratégies pour influencer ce processus à différents niveaux.

Différentes molécules sont impliquées dans ce processus (Figure 12B) :

- les virorécepteurs sécrétés par les poxvirus qui s'attachent aux cytokines ou aux chemokines cellulaires
- les virokines qui ont une fonction agoniste ou antagoniste aux ligands des récepteurs cellulaires.
- les poxvirus agissent également en modulant à leur profit par le biais de protéines virales, l'apoptose cellulaire.



**Figure 12B :** Représentation schématique des immunomodulateurs et régulateurs de l'apoptose sécrétés par les poxvirus. Les symboles rouges représentent les protéines des poxvirus et les symboles noirs et gris représentent les protéines de la cellule hôte (Seet *et al.*, 2003)

## b) Interférence avec le système immunitaire de l'hôte

La réponse de l'hôte à l'infection par les poxvirus est multifactorielle. Immédiatement après l'infection, des mécanismes non spécifiques (apoptose, complément, IFN, cytokines, cellules NK) servent de première ligne de défense. Ensuite, les réponses immunitaires adaptatives médiées par les cellules T cytotoxiques (LTc) et helper (LTh) prennent le relais. Bien que les anticorps neutralisants soient impliqués dans la protection de l'hôte (notamment dans la prévention d'une réinfection), la réponse cellulaire joue un rôle particulièrement important et semble critique pour l'élimination du virus, notamment la RI de type Th1 (T helper 1). Il n'est donc pas étonnant que les poxvirus codent de nombreux facteurs qui suppriment activement la RI innée et la RI cellulaire de type Th1.

### **III. 5. Pouvoir pathogène et Manifestations cliniques**

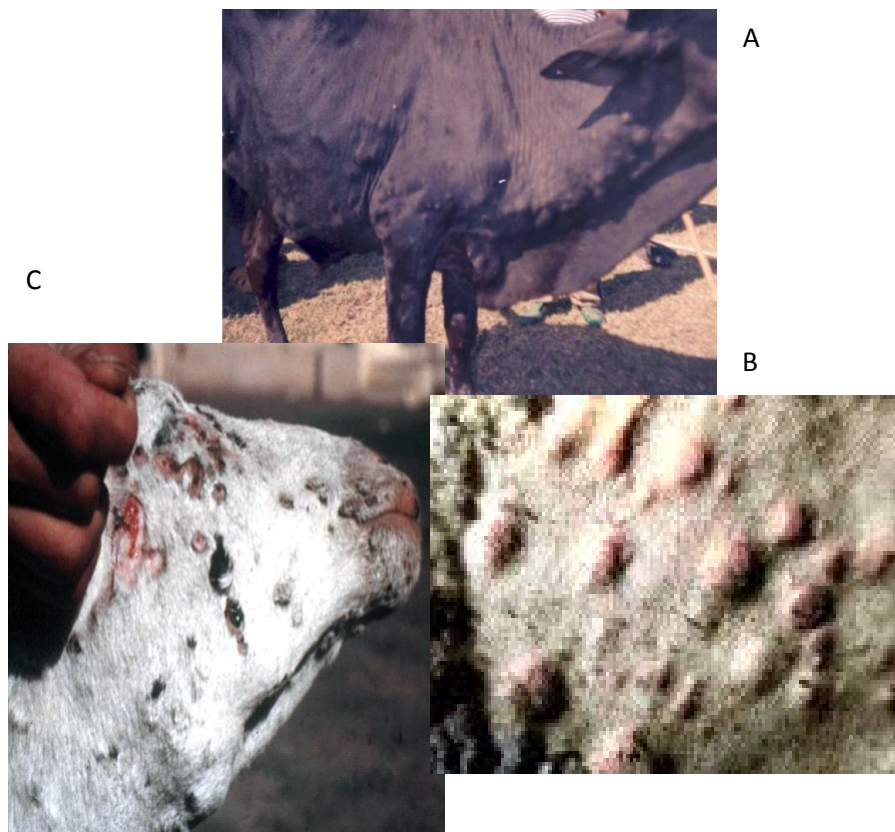
Les symptômes associés aux poxviroses sont globalement identiques quelque soit l'agent pathogène considéré. On peut ainsi distinguer deux formes de pathologie, une forme cutanée et une forme compliquée.

- La forme cutanée est classique et se décompose en 4 phases : la phase d'invasion, la phase d'éruption, la phase de sécrétion et la phase de dessiccation. Lors de la première phase, dont la durée est variable suivant le pathogène, les hôtes manifestent de l'hyperthermie, de l'abattement, une perte d'appétit et des sécrétions lacrymales, salivaires et nasales. Au cours de la phase d'éruption, des tâches roses ou rouges apparaissent, s'étendent rapidement et se transforment en papules de diamètre variable. L'éruption peut se généraliser à tout le corps. Au cours de cette phase, la température de l'hôte redevient normale. Lors de la phase de sécrétion, les papules se transforment en vésicules. Finalement, la dernière phase de la maladie se traduit par une dessiccation des papules et la formation de croûtes. Ces dernières se détachent et font place à des processus cicatriciels laissant des traces indélébiles.

La forme compliquée se présente par des difficultés respiratoires profondes, des jetages abondants et sanguinolents ainsi que des troubles digestifs. Cette forme présente un taux de mortalité élevé chez les jeunes animaux.

### **III.6. Diagnostic de l'infection**

Le diagnostic clinique repose essentiellement sur les éruptions cutanées de forme papuleuse, pustuleuse ou nodulaire. Le diagnostic de laboratoire repose, en premier lieu, sur un isolement puis une amplification de la souche isolée en culture cellulaire à partir des nodules cutanés prélevés sur l'hôte. Les techniques de PCR permettent désormais de différencier les parapoxvirus (virus Orf) des Capripoxvirus (variole ovine/ caprine, dermatose nodulaire. Le diagnostic sérologique repose sur un dépistage des anticorps par neutralisation virale, immunofluorescence ou immunodiffusion sur gel (Lefèvre & Gourreau, 2003; Bertagnoli, 2003, Gourreau, 2003). Même si elle est de moins en moins utilisée, la microscopie électronique représente également une technique efficace pour différencier morphologiquement entre ces différents genres de poxvirus.



**Figure 13 :** Symptômes causés par des infections à poxvirus. A, Chez un bovin atteint de dermatose nodulaire contagieuse (Photo G. Gari, NAHRC, Sebata, Ethiopie) ; B et C, Lésions papulo-vésiculeuses chez une chèvre atteinte de variole caprine (Photo J. Chantal)

### **III.7. Traitement et prophylaxie**

La prophylaxie sanitaire et la vaccination sont les deux principales actions de lutte contre les infections virales. Les pays touchés par ce type d'infection conduisent annuellement des campagnes de vaccination pour protéger le cheptel sensible et aussi s'épargner de flambées épizootiques. Des vaccins à virus vivants atténués sont disponibles, induisant tous une immunité solide et de longue durée. Dans le cas des *Capripoxvirus*, des vaccins recombinants ont été mis au point en utilisant ce dernier comme vecteur d'expression de transgènes. Dans le cas de la dermatose nodulaire contagieuse, deux souches sont couramment utilisées dans des campagnes de vaccination, la souche Neethling (originale d'Afrique du Sud) et la souche KS-1 (originale du Kenya). Cette dernière est thermorésistante, son pouvoir de diffusion est très limité et son pouvoir pathogène résiduel se caractérise par des lésions noduleuses disparaissant en quelques jours chez la chèvre et le mouton. En revanche, cette souche peut

montrer des effets indésirables chez certaines races sensibles de bovins (Yeruham *et al.*, 1994). Toutefois, cette même souche recombinée avec un antigène de la peste bovine n'a induit que des papules au point d'injection se résorbant rapidement chez les bovins (Romero *et al.*, 1993). En Afrique du Nord, où la variole ovine et caprine sévissent sous forme enzootique, la souche Roumania 65 est utilisée pour l'immunisation du cheptel national. Néanmoins ces campagnes vaccinales n'ont jamais atteint plus que les 60% de couverture totale.

### **III. 8. Exemple particulier du vecteur capripoxvirus KS1**

Le vecteur KS1 présente une spécificité d'hôte assez réduite et une apathogénicité sur les hommes et les animaux qui font de lui un vecteur potentiel prometteur dans le domaine vétérinaire.

Ce vaccin atténué LSVD exprimant des antigènes étrangers peut être utilisé à la fois contre une infection hétérologue et contre les infections à *Capripoxvirus* puisque ces derniers ont des propriétés immunologiques communes qui induisent une protection croisée entre les différents membres du genre (Kitching *et al.*, 1986).

Il a été montré que la souche KS-1 exprimant la protéine de fusion du virus de la peste bovine protège totalement le bétail contre une épreuve virulente de peste bovine et de LSDV (Romero *et al.*, 1994). Le même type de résultats a été obtenu par Berhé *et al.*, 2003 avec un vaccin recombinant KS1 exprimant la protéine H du virus de la peste des petits ruminants avec l'obtention d'une protection totale même avec une dose aussi faible que  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/ml. Enfin, les travaux de Perrin *et al.*, 2007 ont permis de mettre en évidence une protection partielle par l'expression de plusieurs transgènes NS1, NS3, VP2 et VP7 du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) par le vecteur KS1.

## **IV- La fièvre de la vallée de rift**

### **IV- 1 Historique de la FVR**

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift aussi appelée à l'origine « hépatite enzootique » en raison de la lésion majeure qu'elle provoque a été décrite pour la première fois en 1931 par Daubney au Kenya dans la région du lac Naivasha en signalant qu'elle peut atteindre l'homme en soupçonnant sa transmission par des insectes hématophages (Daubney *et al.*, 1931). Après la seconde guerre mondiale, elle est signalée en Afrique de l'Est où elle sévit périodiquement comme une maladie essentiellement animale avec de véritables flambées épizootiques. En 1951, en Afrique du Sud, l'épizootie est restée célèbre par la grande mortalité causée et c'est à cette époque que la transmission vectorielle est définitivement prouvée par Smithburn et ses collaborateurs (Smithburn *et al.*, 1949b). Jusqu'en 1975, la FVR fut considérée comme une maladie africaine, d'importance essentiellement vétérinaire (figure 14). Elle provoquait des épizooties principalement chez les ovins en Afrique Orientale et Australe. L'homme n'était qu'un hôte accidentel et les cas humains rarement mortels. En 1975, un épisode épizootique et épidémique a eu lieu en Afrique du Sud. Par la suite, en 1976, le Soudan fut également touché. L'épizootie-épidémie de 1977 en Egypte constitue un véritable tournant dans l'histoire de la maladie puisqu'elle a provoqué plus de 600 cas humains mortels (Meegan, 1979). Des épidémies de FVR de forte ampleur se sont succédées en Afrique de l'Est, notamment au Kenya, en Afrique du Sud, au Zimbabwe, en Zambie et à Madagascar espacées de dix ans pour le Kenya en 1997-98 et en 2006-07 (Flick & Bouloy, 2005 ; Gerdes, 2002; Gerdes, 2004; Morrill & McClain, 1996 ; Peters & Linthicum, 1994). Dans les deux cas, ces épidémies se sont étendues en Somalie et en Tanzanie. Lors de l'épidémie de 1997-1998, le virus s'est propagé vers le Yémen et l'Arabie Saoudite qui, en 2000, subirent un grave épisode épizootique et épidémique avec une mortalité humaine, pour la première fois en dehors du continent africain. Le virus de la Fièvre de la vallée du Rift (VFVR) circule aussi en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale. Dès 1987 en Mauritanie, une épidémie a provoqué 200 cas humains mortels. Fin 2007, la FVR cause une grave épidémie au Soudan, 601 cas cliniques humains ont été rapportés dont 211 mortels, aucun cas clinique animal n'a été officiellement notifié. En avril et mai 2008, Madagascar notifie, dans la région d'Antananarivo, un foyer de FVR touchant des bovins, et plusieurs dizaines de cas humains. En avril 2008, pour la première fois, l'île de Mayotte notifie des cas d'infection humaine et bovine de FVR autochtones (Sissoko *et al.*, 2009). Plus récemment, début 2010, une grande épidémie-épizootie a eu lieu en Afrique du Sud.

## IV. 2. Classification

La famille des *Bunyaviridae* est l'une des plus grandes familles de virus ARN, avec plus de 350 espèces identifiées divisées en cinq genres: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* et *Tospovirus*. Plusieurs membres de cette famille sont considérés comme des virus émergents, et plusieurs d'entre eux sont des agents zoonotiques capables d'infecter les humains et les animaux avec une sévérité variée. Plusieurs types d'encéphalite et de fièvres hémorragiques sont causés par ces virus. Bien que les bunyavirus présentent tous des caractéristiques spécifiques similaires, il existe un certain degré de variabilité entre les différents virus, non seulement en termes d'hôtes mais également du type de vecteurs.

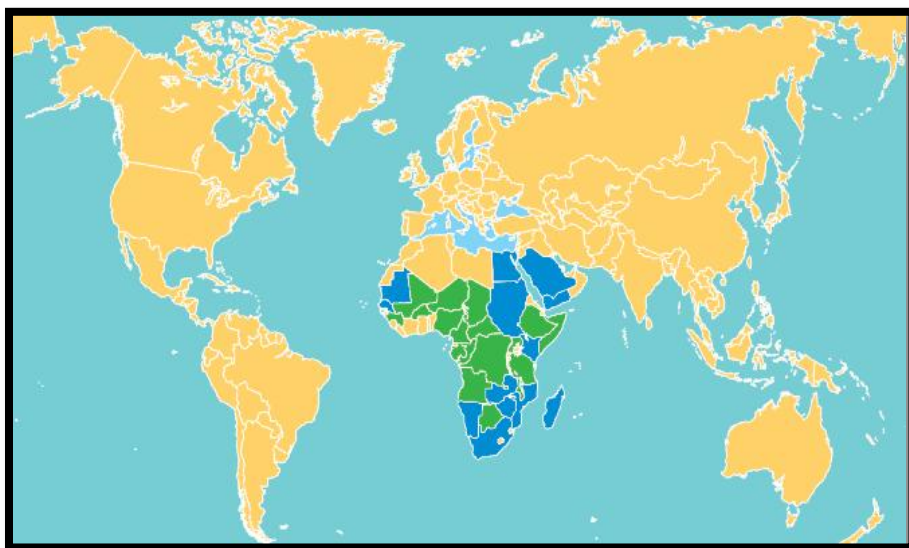
Le genre *phlébovirus* comporte 68 sérotypes divisés en deux groupes antigéniques: le *Phlebotomus* et l'*Uukuniemi* (Giorgi, 1996). Le groupe *Uukuniemi* a d'abord été classé comme un genre à part, bien que la ressemblance avec les membres du *Phlebovirus* ont abouti à l'union des deux genres. Le groupe *Phlebotomus* se compose de treize sérocomplexes et est transmis par les moustiques, les phlébotomes et les *Cératopogonidae*, tandis que le groupe *Uukuniemi* est transmis par les tiques. Ce genre de virus transmis par des arthropodes se propage dans différentes localisations en Asie centrale, en Amérique, en Afrique et en Europe du Sud (Tesh, 1988). Jusqu'à présent, huit virus de ce genre ont été associés à des maladies chez l'homme et leurs symptômes vont d'un état fébrile bénin à une évolution hémorragique et la mort de l'individu. La famille a deux prototypes, le virus de la fièvre de la vallée de rift (FVR) et le virus *Uukuniemi* (UUKV). Le virus de la FVR étant un virus zoonotique qui peut infecter les animaux et les humains.

## IV.3. Épidémiologie et répartition géographique

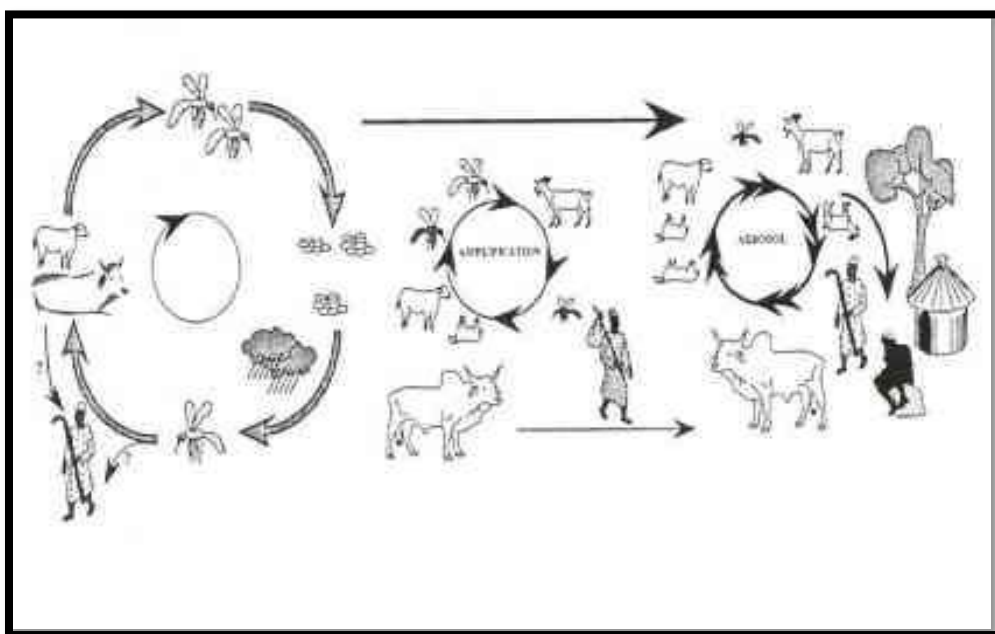
Les principales épidémies ont été décrites en Afrique du sud (1951), en Egypte (1977-1978), au Sénégal et en Mauritanie (1987), au Kenya et en Somalie (1997-1998). Véritable danger sanitaire pour l'homme, la FVR est un fléau économique redouté par les éleveurs. Considérée comme une maladie "émergente", la FVR s'est étendue pour la première fois hors d'Afrique, en Arabie saoudite et au Yémen en 2000 (Abdo-Salem *et al.*, 2006). Cette maladie est aussi connue à Madagascar où le virus a été isolé pour la première fois en 1979 à partir de moustiques. Une épizootie a été signalée chez des bovins en 1990 sur la côte Est de l'île et en 1991 sur les Hauts Plateaux. Des cas humains (formes asymptomatiques) ont été observés à l'abattoir d'Antananarivo la même année ainsi qu'en 2008 où le virus a pu être isolé à partir de différents moustiques des espèces *Aedes* et *Culex* (Ratovonjato *et al.*, 2010) Les dernières



épizooties qui ont sévi en Afrique du Sud et en Mauritanie permettent de confirmer la circulation quasi-permanente de ce virus sur le continent (Promed, 2010).



**Figure 14 :** Distribution du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift en 2007. Les pays où ont eu lieu des épidémies sont en bleu. Les pays en vert sont ceux où la présence du virus a été détectée par des isollements ponctuels, ou par la mise en évidence d'anticorps dans les populations humaines ou animales.



**Figure 15 :** Cycle viral du virus de la fièvre de la vallée de rift en période enzootique et en période épizootique



La maladie se propage chez l'animal par l'intermédiaire de piqûres de moustiques infestés. De nombreuses espèces de moustiques peuvent jouer le rôle de vecteurs : *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*, et aussi des mouches hématophages (*simulies*), des Culicoides, des tiques du genre *Ripicephalus* de façon occasionnelle (Turell *et al.*, 2008a ; 2008b ; Moutailler *et al.*, 2008 ; Sang *et al.*, 2010). Les *Aedes* sont capables de transmission trans-ovarienne (Turell *et al.*, 1984), ce qui permet au virus de se maintenir durablement dans la nature malgré une diminution de la fécondité et de l'espérance de vie de l'insecte, les œufs pouvant survivre plusieurs années dans des conditions de sécheresse. Ainsi, au moment de la saison des pluies, les œufs éclosent, les moustiques se multiplient et transmettent la maladie aux animaux. Ceci pourrait expliquer la présence du virus dans des régions arides en l'absence de réservoir.

Les animaux réservoirs de virus sont les bovins, les moutons, les chameaux et les chèvres. Il existe certainement un cycle sauvage du virus, mais les espèces sauvages sensibles ne sont pas connues. Une épizootie de FVR se manifeste d'abord, en général, par une vague d'avortements dans le bétail, signe annonciateur de l'épidémie. L'épidémie débute après de fortes pluies ou à l'occasion d'inondations qui provoquent la pullulation des moustiques qui transmettent le virus entre les animaux. Elle touche l'homme secondairement. Au cours des épizooties, le contagage se transmet essentiellement par contact direct. Les sources du virus sont toutes les sécrétions (nasales, oculaires, vaginales), les embryons, le placenta et la viande des animaux malades. Le virus pénètre chez l'homme par inoculation (blessure avec un couteau souillé), par inhalation d'aérosols infectieux ou par ingestion (lait ou viande crus). De fait, les éleveurs, les employés d'abattoir, les bouchers ou les vétérinaires constituent des populations à haut risque. Les piqûres par des moustiques infestés pourraient constituer le deuxième mode de contamination de l'homme malgré que la démonstration n'en soit pas faite. Aucune transmission interhumaine directe du virus n'a été observée.

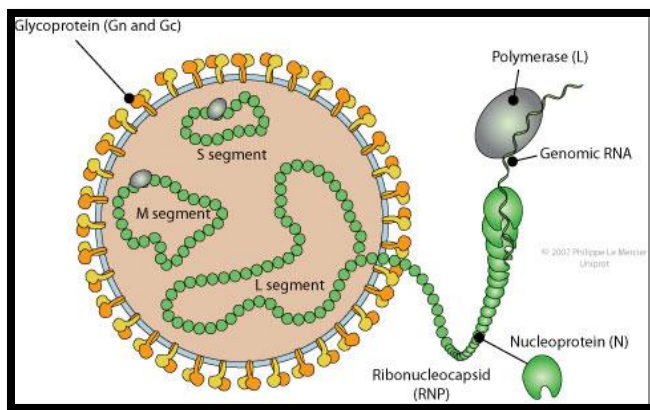
#### **IV. 4. Etiologie du virus de la fièvre de la vallée de rift**

Le virus responsable de la FVR appartient au genre *Phlebovirus*, de la famille des *Bunyaviridae*.

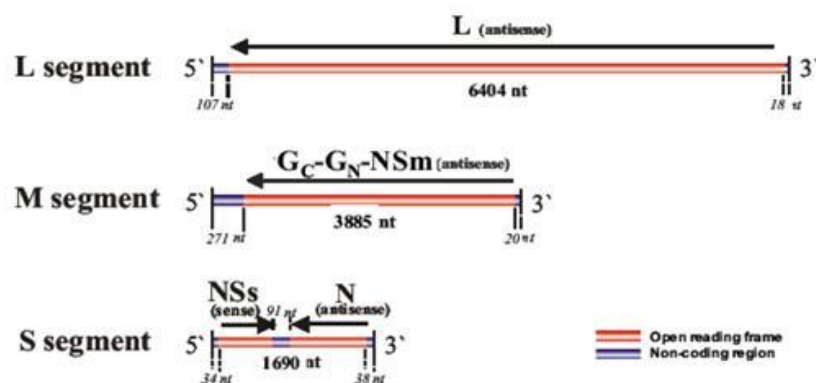
##### **IV.4. 1. Structure du virus**

Le virus de la FVR est un virus à 'ARN linéaire et simple brin enveloppé avec une apparence sphérique ou ovale, et un diamètre de 80-110 nm (Schmaljohn & Hooper, 1996). L'enveloppe

dérive de l'appareil de Golgi et présente des pics qui correspondent aux deux glycoprotéines qui sont incorporés dans les lipides de l'enveloppe (figure 16 et figure 18). L'enveloppe virale entoure le génome, qui est disposé dans une ribonucleoprotéine (RNP) formée d'ARN encapsidé par la protéine de la nucléocapside (N) et de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp; protéine L) interagissant avec le complexe. De cette façon, chaque RNP a plusieurs copies de la protéine N et un seul segment du génome et une polymérase. Les Bunyavirus présentent un génome ARN tripartite, qui se compose d'un grand segment (L), d'un moyen segment (M) et d'un petit segment (S) (Bishop *et al.*, 1980) (figures 16 et 17). Les régions non traduites (UTR) sont très conservées entre les segments et entre les membres d'un même genre, mais ils varient considérablement entre les différents genres. Les extrémités des deux UTR sont complémentaires les unes aux autres et elles sont jumelées *in vivo* ce qui font de la RNP un aspect circulaire.

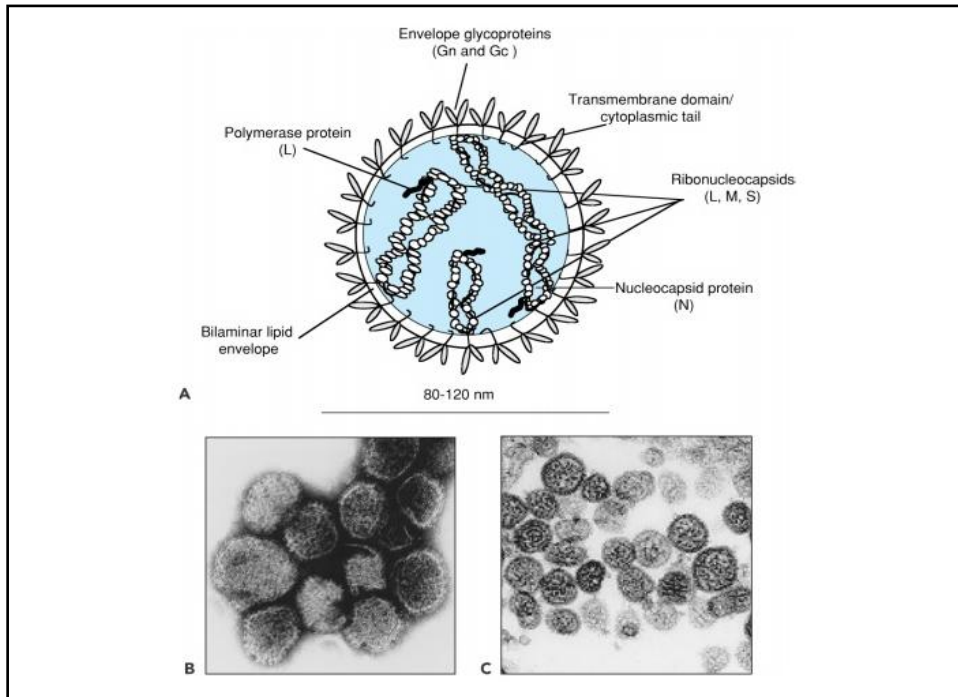


**Figure 16 :** Représentation schématique d'une structure d'un Bunyavirus

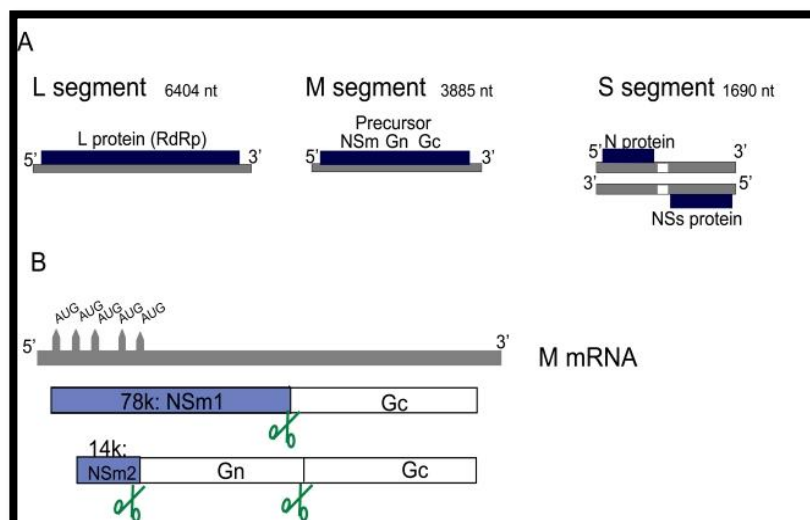


**Figure 17 :** Représentation schématique du génome FVR de la souche MP12 (Flick & Bouloy, 2005)

Le virus de la FVR code pour quatre protéines de structures et deux protéines non structurales (figure 18). Le segment L code pour la protéine RdRp, le segment M code pour les deux glycoprotéines ( $G_c$  et le  $G_N$ ) et une protéine non structurale NSm (figure 19) et le segment S pour la protéine N et une protéine non structurale NSs (Elliott *et al.*, 1991) (figure 16).



**Figure 18** : Morphologie du virus d la fièvre de la vallée du Rift



**Figure 19** : Expression du génome du virus de la FVR. A : représentation schématique des 3 segments ARN du virus ; B : Transcription du segment M en ARNm codant pour une polyprotéine qui par clivage donnera Gn et Gc et NSm

## Fonctions des protéines

### Segment L

Les virus à ARN ne peuvent assurer leur réplication et transcription seulement avec la machinerie cellulaire. Par conséquent, ils ont besoin de leur propre ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), une enzyme multifonctionnelle impliquée dans ces deux mécanismes. L'enzyme procède à de différentes activités, telles qu'endonucléase, transcriptase inverse et réplicase. Cette protéine est la moins exprimée par le virus et est associée avec des membranes périnucléaires. Il est à supposer que la RdRp interagit avec la protéine N et avec l'UTR du virus.

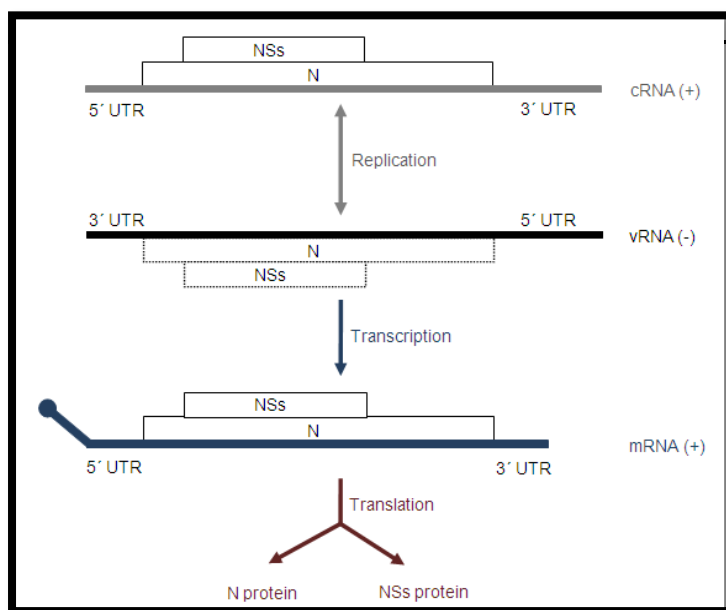
### Segment M

Le segment M code pour les deux glycoprotéines virales  $G_N$  et  $G_C$  et pour une protéine non-structurale NSm. Ces trois protéines sont transcrites en ARNm unique qui se traduit par une polyprotéine qui est clivée par la suite. Les produits synthétisés sont importés dans l'appareil de Golgi. Contrairement aux autres segments, les produits du segment M du virus de la FVR font l'objet d'un post-traitement de la transcription.  $G_N$  et  $G_C$  sont deux protéines transmembranaires de type I avec une teneur élevée en cystéine (Pettersson & Melin, 1996). Leur accumulation dans l'appareil de Golgi conduit à une caractéristique notable de la plupart des membres de la famille des Bunyaviridae: la maturation et le bourgeonnement de cet organelle. L'appareil de Golgi contient des signaux de rétention nécessaires pour la localisation des protéines. La protéine  $G_N$  se trouve également être un facteur déterminant dans la fixation du virus à la cellule hôte, et joue un rôle important dans la virulence du virus. La NSm est une protéine transmembranaire non structurale nécessaire pour la croissance du virus dans les cultures cellulaires. Des études chez les *phlébovirus* ont montré que les cellules infectées par un virus mutant n'exprimant pas la NSm ont subi une apoptose précoce par rapport au virus sauvage et que l'expression de la NSm a été suffisante pour empêcher cette mort précoce (Won *et al.*, 2007).

### Segment S

Le segment S code pour deux protéines, la protéine de la nucléocapside (N) et la protéine non structurale NSs. La nucléocapside N est la première protéine exprimée dans les cellules infectées et la plus abondante. N est la composante du virus responsable de l'encapsidation de l'ARN viral et est située dans le cytoplasme. Dans le genre *phlébovirus*, la protéine N forme

des dimères qui se lient à l'UTR des segments de génome (Le May *et al*, 2000 ;. Mir & Panganiban, 2004). Comme on l'a présenté ultérieurement, la protéine N se lie à l' ARNv et à l'ARNc, mais pas à l'ARNm (figure 20). Comme les deux premiers renferment les séquences UTR , ils sont capables de s'apparier avec leurs extrémités 3 'et 5', tandis que l'ARNm est tronqué au niveau de l'extrémité 3 'et ne fait pas cette structure. Ainsi, il est possible que cette liaison soit nécessaire pour la reconnaissance et l'interaction des protéines N à l'ARN, processus logique, puisque les deux virus et l'ARNc doivent être traités par le RdRp, tandis que les ARNm sont traduits par les ribosomes cellulaires. La protéine N montre également une activité capable de dissocier les duplex ARN (Mir & Panganiban, 2006). La protéine N a un rôle dans la fixation de la RNP nouvellement synthétisée aux filaments d'actine, ce qui pourrait faciliter le transport à l'intérieur de la cellule (Ravkov *et al.*, 1997). Les premières approches sur les fonctions de la protéine NSs, basées sur des virus mutants pour le gène NSs ont montré que c'est une protéine non-essentielle aidant dans la pathogenèse virale. Le mutant a une capacité réduite dans l'arrêt de la synthèse protéique cellulaire, il progresse plus lentement que le type sauvage et induit une réponse interféron  $\beta$  forte. Le même phénomène a été observé pour la protéine NSs de la FVR (Le May *et al*, 2004). Les expériences ont aussi montré que cette protéine est capable de contrôler l'activation du système de l'interféron. Ainsi les hantavirus qui n'expriment pas cette protéine possèdent un autre mécanisme pour échapper au système immunitaire de l'hôte.



**Figure 20** : Processus de répllication et transcription du segment S des Bunyaviridae

### **Fonctions des régions virales non traduites :**

Les régions virales non traduites sont situées à l'extrémité 3' et 5' de la séquence codante. Ces séquences terminales (11 à 21) derniers nucléotides (Nt), sont complémentaires les uns aux autres et sont conservées entre les segments, tandis que le reste de la séquence UTR présente une grande variabilité (Lowen *et al*, 2005). Cette complémentarité participe à la création de la conformation circulaire RNP observée. Ces séquences par elles-mêmes sont capables de diriger la transcription, l'encapsidation, la réplication et l'emballage des segments. Bien que les membres de la famille des *Bunyaviridae* ne présentent pas une queue poly-A, deux types de signaux de terminaison potentiels ont été trouvés : séquences riches en GU et un motif CCCACCC. Le segment S possède deux signaux de terminaison indépendants composé d'un penta-nucléotide séquence (3'-UGUCG-5') (Barr *et al.*, 2006). Enfin, les séquences UTR des *Bunyaviridae* sont nécessaires et suffisantes pour l'emballage des segments. Ce processus est complexe pour les virus segmentés, car ils doivent être en mesure d'emballer au moins un de chacun des segments afin de générer une particule infectieuse.

### **IV.4.2. Cycle viral**

Le cycle de réplication du virus commence par son adsorption et son entrée dans la cellule. Une fois à l'intérieur, la transcription de la protéine virale peut commencer, avec la production des composants de la Ribonucléoprotéine qui, à leur tour vont permettre la réplication du génome. Après ces processus, le virus s'assemble dans l'appareil de Golgi et est relargué hors de la cellule. La figure 21 présente le cycle de réplication pour les membres de la famille des *Bunyaviridae* avec ses différentes phases décrites dans le détail.

#### **L'Adsorption et l'entrée (Phases 1 à 3)**

Le mécanisme par lequel les bunyavirus entrent dans la cellule n'est pas entièrement élucidé. L'attachement du virus aux cellules se fait par une interaction entre l'une des glycoprotéines virales ou les 2 avec des récepteurs cellulaires inconnus. L'existence d'anticorps neutralisants dirigés contre les deux glycoprotéines chez les phlébovirus et les hantavirus - pourrait être une indication que les deux glycoprotéines sont impliquées dans ce processus. Le processus infectieux est dépendant du pH, sans doute parce qu'il affecte la conformation de la glycoprotéine (Overby *et al.*, 2008). Le virus pénètre dans la cellule par endocytose dans des

vésicules qui sont alors transportées vers l'endosome où le processus membranaire conduit à la libération des RNP dans le cytoplasme.

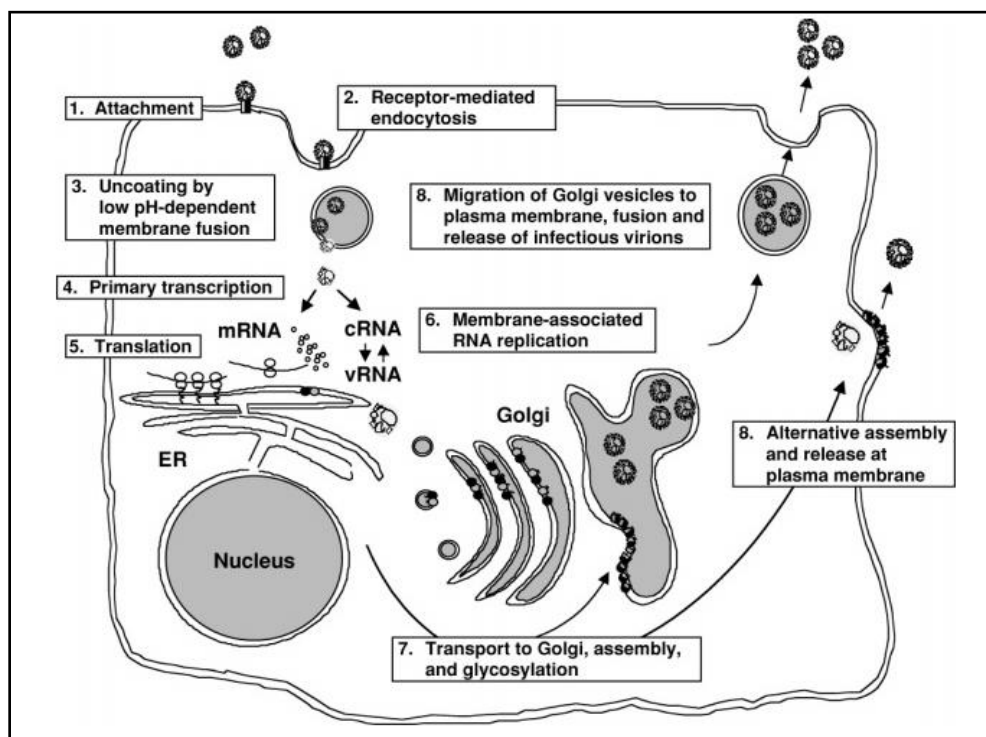
#### La réplication et la transcription de l'ARN (Phases 4 à 6)

Les processus de réplication et de transcription sont contrôlés par l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). Une fois dans la cellule, le virus démarre la transcription primaire dans le cytoplasme, où il produit l'ARNm qui est traduit en protéines virales. L'ARN viral (ARNv) transcrit donne lieu à un ARNm sens positif. La transcription est initiée par un processus dans lequel le virus clive la coiffe de l'ARNm hôte et l'utilise comme une amorce pour sa transcription (Jin & Elliott, 1993). La réplication du génome conduit à la formation d'un ARN complémentaire (ARNc) qui n'est pas traduit en protéines, mais peut, à son tour, servir de matrice pour la synthèse de l'ARNv, sens négatif. Parce que ni l'ARNv ni l'ARNc ne peuvent servir de messenger, l'ARN nu en soi n'est pas infectieux. Il doit être transcrit en ARNm par la RdRp, en passant par une encapsidation par la protéine N. Ainsi, la charge virale et les protéines L et N sont nécessaires et suffisantes pour la transcription et la réplication, et le complexe RNP est l'unité minimale de la réplication du virus. Les ARNc produits lors de la réplication virale fournissent alors de nouveaux génomes encapsidés. D'autre part, lors de l'encapsidation de l'ARN, le virus peut commencer sa transcription secondaire sur les trois segments. Cette transcription varie en quantité en fonction des segments, avec une expression à taux élevé pour le segment S et avec un taux faible pour le segment L. Afin de synthétiser toute la longueur de l'ARNm, la traduction de l'ARNm naissant doit être couplée avec la transcription (Barr *et al.*, 2007). Une fois les protéines N et L traduites, le virus peut passer à la phase de réplication avec la génération, de nouvelles copies du génome complémentaires. Ces copies sont encapsidées par la protéine N (Schmaljohn & Hooper, 1996). L'accumulation de la protéine N semble pouvoir influencer sur l'activité de la polymérase et donc de la réplication. Les protéines virales commencent à être synthétisées peu de temps après l'infection. La transcription, la réplication et la traduction continuent de se produire au cours des étapes de l'infection et de la libération des virions.

#### La Morphogénèse et le relargage des virions (Phases 7 et 8)

Chez les bunyavirus, les glycoprotéines sont d'abord transportées pour former des hétérodimères. Le signal d'hétérodimérisation qui dirige les protéines de l'appareil de Golgi se trouve dans la protéine G<sub>C</sub>, et va permettre à la G<sub>N</sub> d'être transportée dans l'appareil de Golgi également (Pettersson & Melin, 1996). Ces dimères vont s'accumuler dans l'appareil de Golgi

et induisent des changements morphologiques qui sont caractérisés par une vacuolisation et une dispersion (Gahmberg *et al.*, 1986). En microscopie électronique, la visualisation de la RNP, une fois dans l'appareil de Golgi, se fait sous les membranes qui présentent les spicules correspondant aux glycoprotéines, ce qui suggère une interaction directe entre ce complexe RNP et les protéines. Tant la N que les glycoprotéines vont s'accumuler dans l'appareil de Golgi, aucune accumulation de cette protéine N ne se fera dans le réticulum endoplasmique (RE). Par la suite, les virus vont être libérés sous forme de petites particules. Cette libération se fait probablement par exocytose (Matsuoka *et al.* 1991).



**Figure 21** : Représentation schématique du cycle viral du virus de la FVR

## IV.5. Réaction immunitaire et physiopathologie

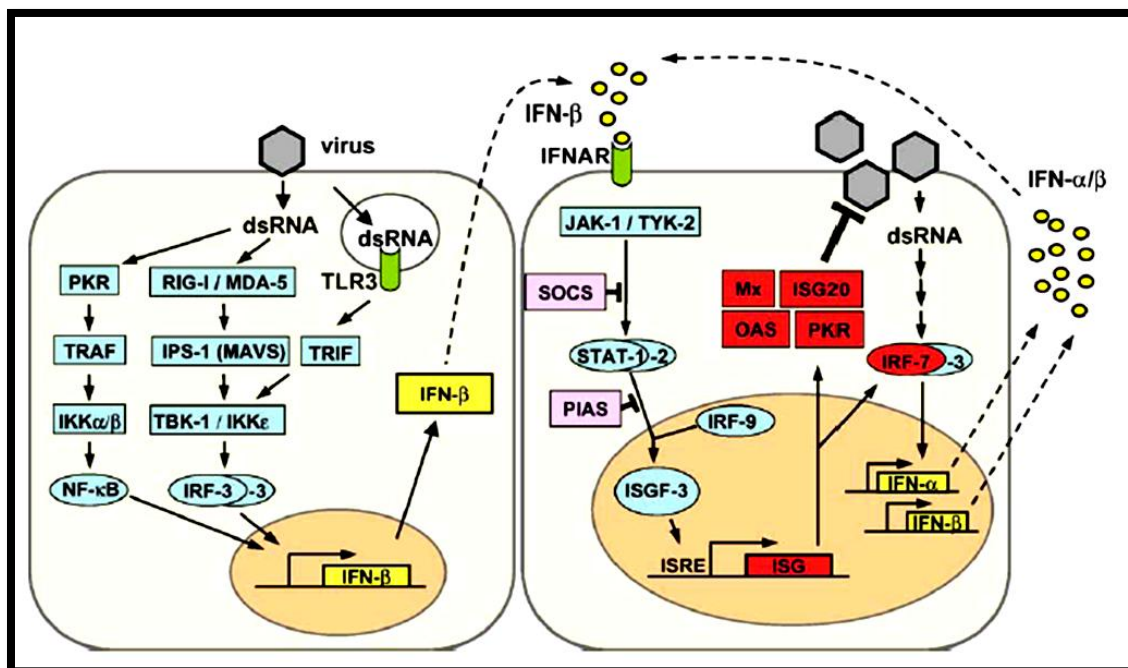
### *Les interactions cellule- hôte*

#### La réponse antivirale et système d'interféron

Les organismes multicellulaires ont plusieurs manières de se défendre contre les infections virales. Ils peuvent activer leur réponse immunitaire cellulaire, qui lutte contre des facteurs externes comme le recours aux macrophages ou aux cellules naturelles tueuses NK. Ces organismes activent également le système immunitaire de type humoral avec l'utilisation



d'anticorps et de cellules T. Toutefois, pour une réponse rapide aux infections virales, les cellules possèdent un système interféron (IFN) qui permet d'induire un effet antiviral dans les cellules infectées et les cellules adjacentes. Les interférons constituent un groupe de cytokines qui peuvent être divisés en trois groupes (de type I, II et III), mais toutes les molécules de ce groupe ne sont impliqués dans la réponse virale. Le système IFN peut être activé par plusieurs voies, telles que l'ARN double brin viral et l'ARN intracellulaire. Une fois les signaux d'activation induits, la cascade des interférons est libérée et activée (figure 22). Ces facteurs, combinés avec d'autres sont à l'origine de l'activation du gène de l'IFN- $\beta$ . Après cela, la sécrétion d'IFN- $\beta$  interagit avec les récepteurs cellulaires de la cellule en question et des cellules adjacentes, conduisant à la synthèse de composants anti-viraux par une régulation positive des Interferons Stimulated Gene (ISG) (Randall & Goodbourn, 2008). La voie d'activation de l'IFN- $\beta$  est schématisée dans la figure 22.



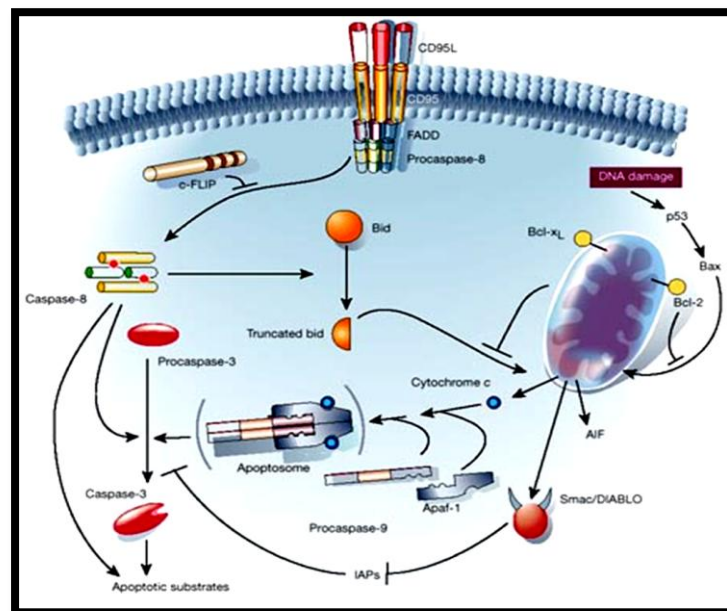
**Figure 22 :** Représentation schématique de l'activation de l'IFN- $\beta$  vis à vis d'une infection virale au sein d'une cellule (Haller *et al.* 2006)

Pour être capable d'infecter, de se transcrire et de se répliquer dans les cellules, de nombreux virus ont adopté des mécanismes d'échappement au système interféron dont l'inhibition des signaux initiateurs. La protéine NSs est capable de contrôler l'induction de ce système, comme d'interférer avec la voie apoptotique de l'hôte. Chez les Bunyaviridae, l'inhibition du système interféron pourrait être liée à l'inhibition de l'activité de l'ARN polymérase stoppant la transcription de l'IFN- $\beta$ .

## L'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire programmée qui peut être induite par différents stimuli. Deux grandes voies ont été décrites (figure 23). Un certain nombre de changements cellulaires sont caractéristiques de cette mort cellulaire : la condensation de la chromatine et la réduction du volume cellulaire. La relation entre l'infection virale et l'apoptose est extrêmement complexe (Hardwick, 2001). Dans la famille des Bunyaviridae l'interaction entre le virus et la machine apoptotique de la cellule hôte diffère entre les différents genres. Pour les Phlebovirus, des études ont été menées avec le virus Punta Toro (PUTV) et le virus FVR (VFVR). Des infections par le VFVR sauvage et un virus FVR mutant pour la NSm a montré que cette protéine NSm neutralise la mort rapide des cellules par apoptose suggérant une médiation par la caspase 8, la protéine NSm agissant alors comme suppresseur de l'activité de la caspase 8 (Won *et al.*, 2007).

D'autre part, des cellules infectées par des mutants délétés pour la protéine NSs présentent une apoptose précoce par rapport à des cellules infectées par le virus sauvage mettant en avant l'activation des systèmes de l'interféron et la diminution de la capacité des protéines d'arrêt shut-off des cellules hôtes (Kohl *et al.*, 2003).



**Figure 23** : Représentation des deux principales voies de l'apoptose dans les cellules de mammifères (Hengartner, 2000).

#### **IV.6. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques**

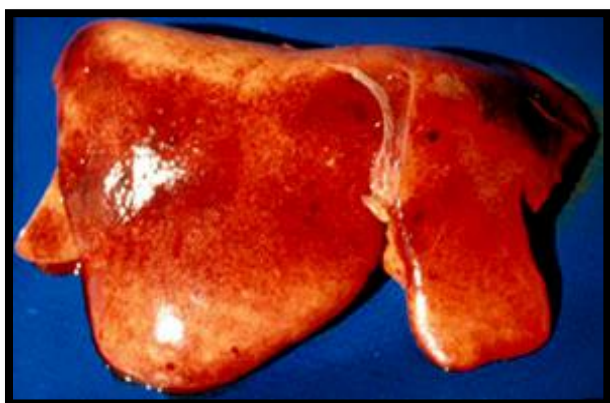
L'infection par le virus de la fièvre de la vallée de rift reconnue en tant que zoonose, se manifeste cliniquement chez l'animal et chez l'homme par des symptômes différents (Tableau 3).

Mortalité >70%	Mortalité élevée 10-70 %	Maladie grave quasi rarement mortelle	Elaboration d'anticorps	Réfractaires
Agneaux Chevreaux Chiots Chatons Souris Rats	Ovins Veaux Certains rongeurs	Humains Bovins Caprins Buffles africains Buffles asiatiques Singes	Dromadaires Chevaux Chats Chiens Porcs Anes Lapins	Oiseaux Reptiles Amphibiens

**Tableau 3 :** Espèces affectées par le virus FVR et sensibilité observée (Swanepoel & Coetzer, 1996)

##### **IV.6.1. Chez l'animal :**

Les symptômes de la FVR ne sont pas spécifiques et varient en fonction de l'espèce et de l'âge des animaux. Ils sont dus à un tropisme particulier du virus pour les hépatocytes (hépatite nécrosante) et les cotylédons chez les femelles en gestation. La durée d'incubation est, elle aussi, très variable, de quelques heures dans la forme suraiguë à trois semaines dans la forme subaiguë. Le Code zoosanitaire de l'OIE a retenu 30 jours comme durée maximale.



**Figure 24 :** Hépatite nécrosante : foie décoloré et friable (collection département EMVT du CIRAD)

La forme suraiguë n'est observée que chez les agneaux ou les chevreaux nouveau-nés. Après une incubation de 12 à 72 heures, les seuls symptômes observables sont une forte hyperthermie, de l'inappétence et des douleurs abdominales. L'animal tombe rapidement en décubitus et la mort survient en 24 heures. La mortalité peut atteindre 90 % (figure 25).



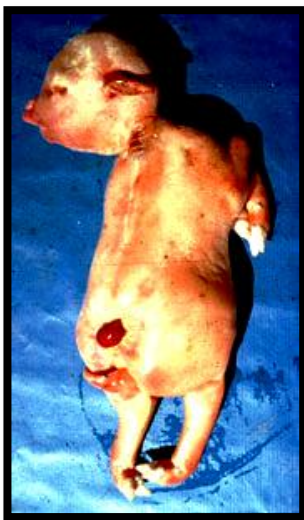
**Figure 25** : Cas d'épizootie mortelle de FVR chez des veaux

La forme aiguë est décrite chez les ovins adultes et les jeunes de plus de trois semaines : après une incubation légèrement plus longue (de deux à cinq jours), les premiers symptômes sont une forte fièvre, un jetage mucopurulent strié de sang, des vomissements et une diarrhée putride hémorragique. Ces symptômes apparaissent peu de temps avant la mort. Quand celle-ci est différée, on peut aussi noter un ictère. La mortalité est de l'ordre de 20 à 30 %. Chez les veaux, la forme aiguë est fréquente avec hyperthermie, faiblesse générale, refus de se déplacer, diarrhée fétide et souvent polypnée et dyspnée. Lorsqu'ils sont atteints par une forme aiguë, les bovins adultes présentent de l'hyperthermie pendant deux à quatre jours, de l'anorexie, du jetage mucopurulent, une diarrhée hémorragique ; quand la maladie évolue sur une ou deux semaines, un ictère net apparaît. La mortalité varie, chez les jeunes, de 10 à 70 %, mais dépasse rarement 10 % chez les adultes.



**Figure 26** : Exemple d'un ovin atteint des signes cliniques de la FVR sous sa forme aigue

La forme subaiguë se rencontre essentiellement chez les ovins, les caprins et les bovins, l'avortement est, en règle générale, le seul signe mais il peut être observé chez 80 à 90 % des femelles en gestation (figures 26 et 27). Du reste, une augmentation du taux d'avortements est un signe d'appel dans les régions où la FVR est enzootique



**Figure 27** : Avorton (collection département EMVT du CIRAD)

#### IV.6.2. Chez l'homme :

L'incubation est de 2 à 6 jours, suivie par un syndrome dengue-like caractérisé par l'installation brutale de fièvre, de céphalées, de myalgies, de rachialgies. Une raideur de la nuque et une photophobie peuvent faire penser à une méningite. La maladie évolue en 4 à 7

jours vers une guérison sans séquelles, mais la convalescence peut durer 2 à 3 semaines. Cette forme dite bénigne représente plus de 95% des cas symptomatiques.

Les formes asymptomatiques sont fréquentes, environ un cas sur deux. A l'opposé, des formes graves s'observent dans 3 à 4% des cas. Elles se manifestent sous la forme d'un ou plusieurs syndromes : atteinte oculaire, méningo-encéphalite, fièvre hémorragique.

- L'atteinte oculaire apparaît en général entre une à trois semaines après les premiers signes cliniques. Les lésions siègent au niveau de la rétine et peuvent entraîner une baisse permanente de l'acuité visuelle, voire une cécité.

- La méningo-encéphalite apparaît de même une à trois semaines après les premiers symptômes. Des séquelles sont possibles, notamment à type de paralysie et de détérioration mentale.

- La FVR peut être cause d'une fièvre hémorragique. Deux à quatre jours après le début de la maladie, le patient présente une hépatite avec ictère et syndrome hémorragique : vomissements de sang, méléna, purpura, gingivorragies. Elle peut être précoce dès le 2<sup>ème</sup> jour. Elle ne s'observe que dans 1% des cas. La mortalité des formes hémorragiques serait d'environ 5%.

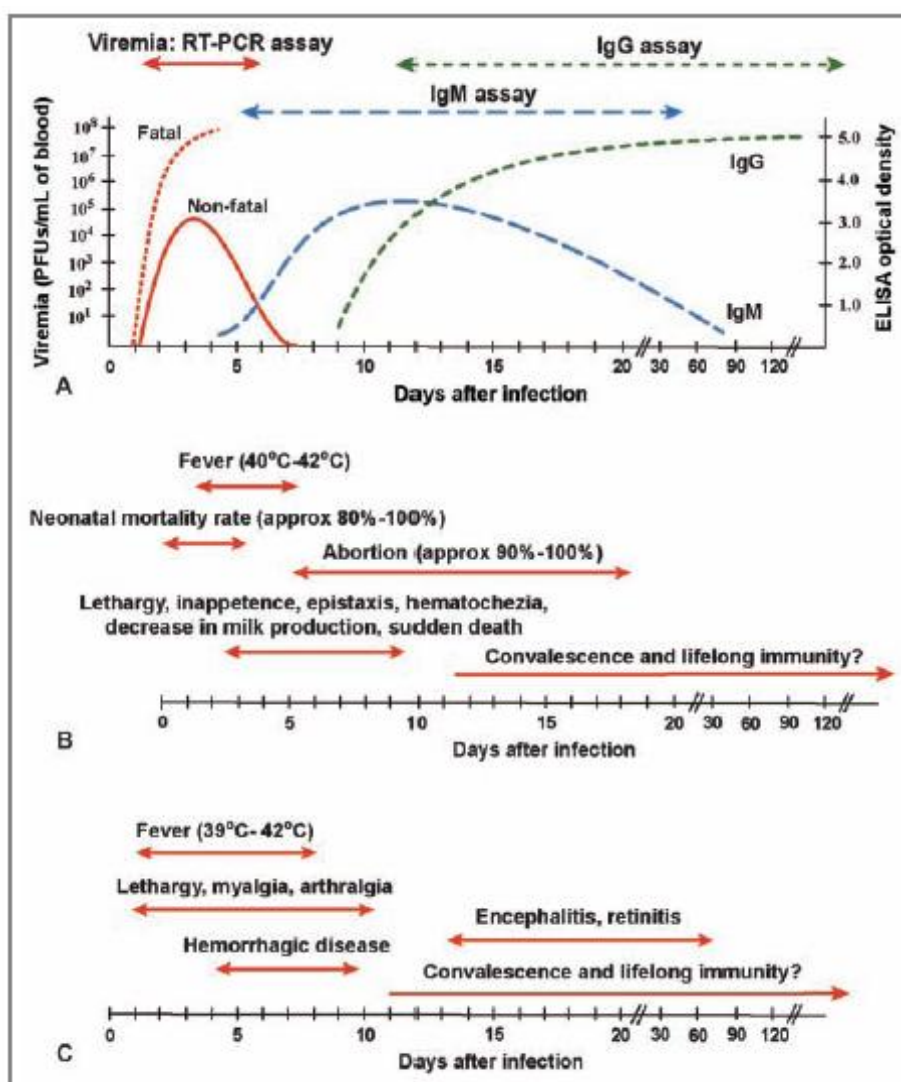


**Figure 28 :** Rétinite, avec exsudats et hémorragies maculaires et péri-maculaires, chez un patient atteint de fièvre de la Vallée du Rift (Al-Hazmi et al. , 2003 avec la permission de l'éditeur (licence N° 2171210402185).



#### IV. 7. Diagnostic de l'infection par le virus de la FVR

Il est orienté par la clinique et le contexte (enzootie avec avortements nombreux qui précède les cas humains). Dans les régions d'endémie ou dans les régions limitrophes, toute mortalité élevée des agneaux et des chevreaux associée à une augmentation des taux d'avortement chez les femelles doit attirer l'attention. Il n'existe à ce jour qu'un sérotype du virus, et les techniques utilisées ne semblent pas détecter de réactions croisées avec les autres virus du genre *Phlebovirus*.



**Figure 29 :** Diagnostic de la FVR associée aux symptômes chez l'homme et l'animal. A, cinétique de la virémie et de l'apparition des anticorps anti-FVR chez les animaux, B, cinétique des symptômes observés chez les animaux ; C, cinétique des symptômes observés chez l'homme d'après Bird *et al.*, 2009.

La mise en évidence du virus de la FVR doit faire partie d'une approche intégrée impliquant la détection du génome viral (par RT-PCR ou PCR temps réel), détection de l'antigène et des

anticorps de type IgM ou IgG par ELISA ou Immunofluorescence. La réalisation de tests virologiques, ne sont réalisables que par des laboratoires spécialisés de type BSL-3 (Biosafety Level 3), en raison du classement du virus en tant que virus de classe 3.

### Mise en évidence du virus

Le virus peut être détecté très rapidement dans la première semaine qui suit l'infection par immunofluorescence ou par différentes méthodes de biologie moléculaire de RT-PCR conventionnelle qui se révèlent extrêmement sensibles (Jupp *et al.*, 2000 ; Sall *et al.*, 2001 ; 2002). Des techniques de PCR temps réel ont également été développées récemment et sont basées soit sur le gène L (Bird *et al.*, 2007 ; Peyrefitte *et al.*, 2008 ; Le Roux *et al.*, 2009) ; le gène G<sub>N</sub> (Drosten *et al.*, 2002 ; Njenga *et al.*, 2009), le gène N (Naslund *et al.*, 2008) ou le gène NSs (Garcia *et al.*, 2001). Ces techniques peuvent se réaliser à partir de prélèvements de foie, rate ou cerveau sur avortons et de sang total sur animaux malades.

L'isolement du virus se fait soit sur animaux de laboratoire à des hamsters ou souris adultes par voie intra péritonéale soit par voie intracérébrale à des souriceaux-nouveaux nés soit sur cellules. De nombreuses lignées cellulaires sont utilisées pour isoler le virus : cellules primaires de rein ou de testicules de mouton, cellules de lignées (VERO, BHK21), cellules de moustiques *Aedes albopictus* (Anderson *et al.*, 1989). Un test ELISA de capture a été mis au point se révélant d'une grande utilité pour les suivis épidémiologiques (Niklasson *et al.*, 1983 ; Peters *et al.*, 1989).

### Diagnostic sérologique

La détection des anticorps de type IgM et IgG apparait après 4 à 6 jours d'évolution clinique (figure 29). La détection des anticorps spécifiques anti-FVR peut se faire par la technique de séroneutralisation virale nécessitant l'utilisation de lignées cellulaires et manipulation de virus vivant ou par tests ELISA. Plusieurs tests ont été mis au point, ils sont bien souvent sur la protéine N à la fois sensibles, spécifiques et faciles d'emploi (Paweska *et al.*, 2005 ; 2007 ; 2008 ; Van Vuren *et al.*, 2007 ; 2009 ; Fafetine *et al.*, 2007). Un certain nombre de tests ELISA ont été développés dans les laboratoires de référence basé sur l'expression de la protéine N ou des antigènes entiers inactivés. L'intérêt de ces techniques rapides, peu onéreuses et d'utilisation facile est évident pour les enquêtes sérologiques en vue d'identifier des zones ou des périodes à risque et d'éventuels cycles d'amplification. Des tests ELISA qui permettraient de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés sont en cours d'étude (Mc El Roy *et al.*, 2009).



## IV.8. Traitement et prophylaxie

On trouve aujourd'hui un certain nombre de vaccins anti-FVR à usage vétérinaire, actuellement aucun d'entre eux n'a obtenu de licence pour commercialisation aux Etats-Unis et en Europe. Les différents types de vaccins seront décrits en fonction de leur conception :

### 1 - les vaccins inactivés

Un **vaccin inactivé** à la formaline à usage humain nommé TSI-GSD-200 a été produit aux Etats-Unis (Randall *et al.*, 1962 ; 1964) . Son utilisation est restée expérimentale, pour les vétérinaires et les personnels des laboratoires à fort risque d'exposition au virus malgré que son immunogénicité ait été prouvée (Pittman *et al.*, 1999).

Un **vaccin inactivé** à la formaline à usage vétérinaire a été développé mais nécessite 3 inoculations successives espacées de 1 à 2 mois suivie par un rappel de vaccination annuelle (Barnard *et al.*, 1977 ; 1979 ; Harrington *et al.*, 1980)

### 2 - les vaccins atténués par passage *in vitro*, *in vivo* ou sur support cellulaire

- **La souche neurotrope Smithburn**, a été et reste encore largement employée. Il s'agit d'une souche originaire d'Ouganda (*Entebbe*) neuroadaptée par passage intra-cérébral chez des souriceaux nouveau-nés et des oeufs embryonnés (Smithburn, 1949a) Toutefois, ce vaccin entraîne des effets tératogènes chez 15 % des brebis gestantes avec des anomalies du système nerveux central chez les fœtus

- **La souche MVP12**, obtenue par mutagenèse d'une souche virulente isolée en Egypte (Zagazig 548) en 1977, semble induire une bonne immunité (Caplen, *et al.*, 1985 ; Saluzzo *et al.*, 1990), elle présente des mutations dans chacun des trois segments du génome viral et pourrait être utilisée aussi bien chez les ruminants adultes que chez les jeunes animaux (Morrill *et al.*, 1997a ; 1997b). Toutefois, elle provoque des effets abortifs et tératogènes chez les brebis gestantes (Hunter *et al.*, 2002) et est neuro-virulente pour les singes inoculés par voie intracérébrale (Morrill & Peters, 2003).

- **Le Clone 13** est un virus naturellement atténué, possédant une large délétion dans le gène NSs, à l'origine de son avirulence et rendant improbable toute réversion vers un phénotype virulent. Il est fortement immunogène pour la souris et le mouton et son inoculation est sans effet nocif chez la brebis gestante. Ce Clone 13 serait un bon candidat vaccin (Muller *et al.*,

1995 ; Dingu *et al.*, 2010). Un autre virus naturellement muté pour les gènes NSs et NSm semble être prometteur (Bird *et al.*, 2008b)

- **La souche R566**, un réassortant associant le segment S du clone 13 et les segments M et L du MVP12 est également un candidat sérieux (Bouloy & Flick, 2009)

### 3 - Les vaccins de nouvelle génération

- **Les vaccins basés sur la génétique inverse** : la manipulation des génomes des virus à ARN négatif permet de générer des virions infectieux à partir de cDNAs clonés par génétique inverse (Bouloy & Flick, 2009, Habjan *et al.*, 2009). Ces systèmes de génétique inverse ont révolutionné l'étude de l'expression des gènes viraux et ont permis de mieux comprendre le rôle des protéines de régulation durant les étapes de transcription/réplication et d'identifier les composants viraux interagissant avec la cellule hôte. Les avancées de génétique inverse devraient permettre de construire des virus modifiés, conduisant à de nouvelles perspectives pour produire des vaccins efficaces et sans danger

- **Les VLPs** : les gènes codant pour la nucléocapside ou les glycoprotéines majeures contre lesquelles la réponse immune de l'hôte est dirigée peuvent également être clonés dans un vecteur (bactérie, virus) tel que le système baculovirus très utilisé pour la production de structures protéiques reconstituant le virus (virus-like particles VLPs) (Näslund *et al.*, 2009 ; Habjan *et al.*, 2009 ; De Boer *et al.*, 2010).

- **Les vaccins recombinants** : le système des vaccins recombinants adénoviraux ou alphaviraux a également été très largement testé mais reste à l'état de recherche et n'est pas commercialisé (Holman *et al.*, 2009 ; Heise *et al.*, 2009). Des recombinants poxviraux ont également été très récemment construits à partir du virus de la vaccine (Kakach *et al.*, 1988) ou de capripoxvirus (Wallace *et al.*, 2005 ; 2006). Un paramyxovirus a récemment été étudié comme candidat vaccinal pour la FVR (Koetekaas *et al.*, 2010b)

- **La vaccination par ADN** est une stratégie qui a été abordée dans le cas de la FVR. Les constructions ont induit une immunogénicité chez les souris dans certains cas (Lagerqvist *et al.*, 2009 ; Lorenzo *et al.*, 2010) et beaucoup moins dans d'autres (Spik *et al.*, 2006). Des combinaisons d'ADN nu et de constructions basées sur les alphavirus semblent donner une bonne protection (Bhardwaj. *et al.*, 2010).

La vaccination appliquée en début d'épizootie permet de réduire l'incidence de la maladie, mais les plans de contrôle sont malheureusement pris de vitesse par la propagation rapide de l'infection. L'acte de vaccination est cependant dangereux dans un foyer, car l'infection peut être facilement propagée par la réutilisation de la même aiguille chez plusieurs animaux.

La lutte contre les épidémies des animaux d'élevage repose sur l'identification des conditions de transmission (périodes de fortes pluies et pullulation des vecteurs) et la vaccination préventive. Un contrôle des animaux doit être effectué régulièrement, au moins pour ceux destinés à l'exportation, puisqu'une réglementation internationale l'exige. Lorsque les animaux sont touchés, les contacts avec leurs produits doivent être évités avec la mise en place de mesures de protection individuelles ; une protection contre les vecteurs doit également être réalisée ou renforcée.

#### **IV.9. Contrôle de la maladie**

Comme tous les virus à ARN, le VFVR est capable de muter rapidement, et on connaît déjà plusieurs variants de ce virus. Cependant, en étudiant l'épidémie de 2006, des auteurs ont constaté une augmentation récente de la diversité génétique et de la taille des populations virales en circulation, indiquant une forte activité virale dans les périodes inter-épidémiques qui ont précédé (Bird *et al.*, 2008a). Ce constat n'est pas surprenant et vient concrétiser des craintes formulées pour les virus à ARN. L'occasion donnée à ces virus d'atteindre de nouvelles populations sensibles et dans des régions nouvelles augmente leurs possibilités d'évolution et peut permettre l'émergence de virus aux propriétés nouvelles (Tolou *et al.*, 2002). On sait, par ailleurs, que le VFVR peut infecter une grande variété d'arthropodes, dont beaucoup se trouvent en zone tempérée, et seraient capables de transmettre le virus (Turell *et al.*, 2008a ; 2008b ; Moutailler *et al.*, 2008). Ainsi, le virus de la fièvre de la Vallée du Rift pourrait s'étendre au delà de son aire de répartition actuelle, comme il l'a fait en Arabie Saoudite, mais aussi subir des évolutions qui lui permettraient par exemple de s'adapter à de nouveaux vecteurs et à de nouveaux hôtes, ou de provoquer une infection d'évolution différente. Cependant, la nature segmentée du génome du RVFV rend l'évolution génétique du virus plus facile et plus ample, car elle peut se faire par échanges de segments lorsque des hôtes et des cellules sont infectés simultanément par deux virus différents. Ce mécanisme extrêmement important est bien connu pour le virus de la grippe, il est aussi décrit chez des bunyavirus très proches de RVFV (Gerrard *et al.*, 2004). L'importance du virus FVR pour la santé animale et l'économie des pays africains, plus encore que son impact sur la santé

humaine, a justifié la recherche de moyens performants de surveillance et de prévention des épidémies. Les études menées à l'aide de prises de vue effectuées par des satellites ont ainsi montré qu'il existait une bonne corrélation entre des paramètres mesurables (niveau des précipitations et des eaux de surface, importance et nature de la végétation) et le début puis l'extension des épidémies animales (Clements *et al.*, 2007 ; Marechal *et al.*, 2008 ). L'aboutissement de ces travaux pourrait donner à plusieurs pays et à des organismes internationaux les moyens d'agir en amont sur la circulation du virus ou de déclencher suffisamment tôt des mesures de protection animale ciblées, techniquement réalisables et économiquement supportables (Anyamba *et al.*, 2009).

## **V. La peste des petits ruminants**

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie virale, contagieuse, cliniquement grave et à déclaration obligatoire. Elle affecte les petits ruminants domestiques chèvres et moutons. La faune sauvage est également sensible à cette infection. La PPR est à l'origine d'énormes pertes sanitaires et économiques qui touchent les élevages et les pays atteints. L'infection par le virus de la PPR a constamment enregistré un taux de morbidité de 80% et un taux de mortalité de 90-100%.

### **V.1 Historique de la PPR**

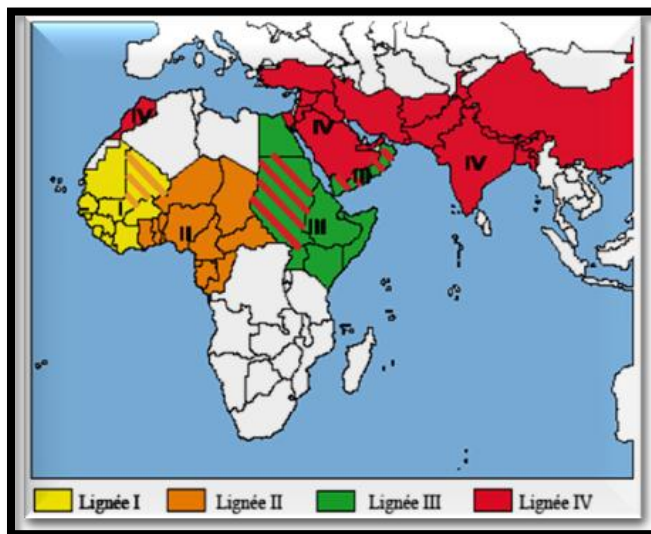
La peste des petits ruminants (PPR) a été décrite pour la première fois en 1942 en Côte d'Ivoire par Gargadennec et Lalanne (Gargadennec *et al.*, 1942). En effet, cette découverte a eu lieu suite à l'apparition de foyers cliniquement identiques à ceux du virus de la peste bovine et ne touchant que les petits ruminants. Pendant près de quinze ans, la maladie n'est signalée que dans ces 2 territoires de l'Afrique occidentale française puis en 1955, elle est décrite pour la première fois au Sénégal. En 1962, Gibert et Monnier réussissent à cultiver le virus sur cellules (Gilbert *et al.*, 1962) et en 1967, Bourdin et Laurent-Vautier publient les premières photographies en microscopie électronique (Bourdin & Laurent-Vautier, 1967). Parallèlement, des analyses sérologiques, des expériences de protection croisée et des analyses biochimiques aboutissent à la distinction entre PPR et peste bovine et, en 1979, le virus de la PPR est classé dans le genre Morbillivirus, famille des Paramyxoviridae au même titre que celui de la peste bovine, le virus de la rougeole, et de la maladie de Carré (Diallo *et al.*, 1987 ; 1989a ; Gibbs *et al.*, 1979). La pasteurellose et la peste bovine ont retardé la reconnaissance de la PPR en raison de la présence de symptômes respiratoires provoqués par des surinfections bactériennes et de l'existence de symptômes semblables provoqués par la peste bovine respectivement, ceci étant observé aussi bien sur les bovins que les petits ruminants. La PPR a toujours sévit sous forme enzootique dans les pays de l'Afrique subsaharienne, dans les pays du Moyen-Orient et ceux de l'Asie du sud ouest. A partir des années 2000, la PPR est apparue pour la première fois dans de nouveaux pays. En 2004, des foyers ont été déclarés en Turquie dans la province d'Edirne (Anderson *et al.*, 2005 ; Kul *et al.*, 2007). Plus récemment encore, en été 2008, des foyers de PPR ont été observés et déclarés au Maroc et jusqu'aux frontières avec l'Algérie (Sanz-Alvarez *et al.*, 2008).

## V.2 Classification et répartition géographique

La peste des petits ruminants est due au virus de la Peste des Petits Ruminants (PPRV) qui appartient à la famille des *Paramyxoviridae* et au genre *Morbillivirus*. Ce genre renferme six espèces dotées d'une grande spécificité d'hôte (Barrett *et al.*, 1999) :

Le virus de la peste des petits ruminants affecte les ovins, caprins et les petits ruminants de la faune sauvage. Le virus de la peste bovine (RPV pour Rinderpest virus) atteint les artiodactyles et particulièrement les bovins et les buffles. Le virus de la rougeole (MV pour Measles virus) est spécifique à l'homme. Le virus de la maladie de Carré (CDV pour Canine Distemper virus) atteint les canidés alors que le Phocine Distemper virus (PDV) atteint les phoques et le Cetacean Morbillivirus (CMV) les cétacés.

L'alignement phylogénétique des différentes souches de PPR basé sur le gène de la nucléoprotéine N a mis en évidence quatre lignées virales différentes : trois lignées sont réparties sur le continent africain (lignées I, II et III) et une sur le continent asiatique (lignée IV) (figure 30) (Kwiatek *et al.*, 2007).



**Figure 30** : Répartition géographique de la PPR en 2008 (Minet *et al.*, 2009)

### V.3. Etiologie du virus de la PPR

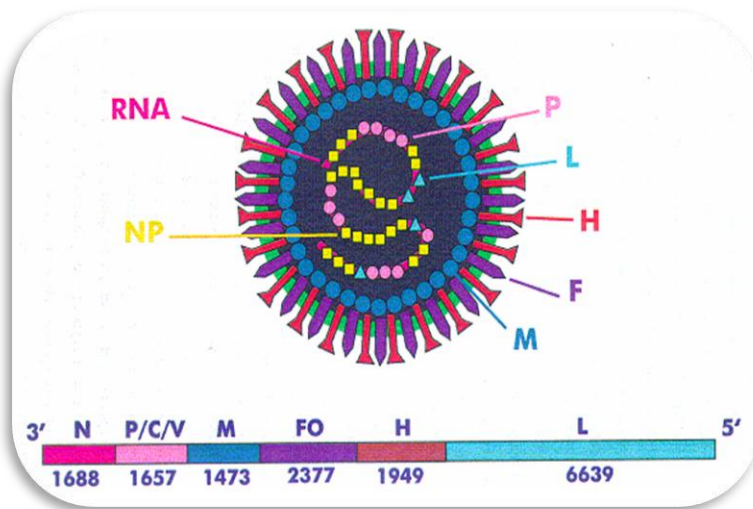
#### V.3.1 Structure du virus :

Le virus de la PPR appartient à la famille des *Paramyxoviridae* et au genre *Morbillivirus*. Comme tous les *Morbillivirus*, c'est un virus enveloppé, pléomorphe et dont le diamètre varie de 150 à 700 nm. Son génome viral a une taille d'environ 16 kb et respecte « la règle des six » qui s'applique à tous les virus de la sous famille des *Paramyxovirinae*. Le génome dont la séquence vient d'être déterminée est constitué d'un brin d'ARN monocaténaire non segmenté qui se dit négatif car ne peut être traduit en protéines : lors de la multiplication virale, il doit d'abord être transcrit en ARN messagers (ARNm) par la polymérase virale. Ces derniers, monocistroniques- car chacun est la copie d'un seul gène- sont traduits en protéines virales par la machinerie enzymatique de la cellule infectée. Le virion est composé de six protéines structurales (figure 31) :

- La nucléoprotéine N, responsable de la structure hélicoïdale de la nucléocapside, la plus abondante dans le virus et la cible préférentielle des anticorps permettant l'utilisation des antigènes N en tests de diagnostic. Elle est responsable de la structure hélicoïdale de la nucléocapside
- La phosphoprotéine P qui interagit avec N pour favoriser l'encapsidation des ARN néosynthétisés et avec L dans la synthèse de l'ARNm et la réplication de l'ARN viral génomique
- La protéine de matrice M qui sert de lien entre la nucléocapside et les deux glycoprotéines de surface F et H
- La protéine de fusion F, responsable de la fusion entre la membrane virale et celle de la cellule hôte et cible d'anticorps neutralisants in vitro, utilisés en tests de diagnostic
- L'hémagglutinine H qui permet la fixation du virus au récepteur de la cellule hôte et cible d'anticorps neutralisants in vitro, utilisés en tests de diagnostic
- L'ARN polymérase ARN dépendante L qui intervient dans la polymérisation de l'ARN et au cours des étapes d'initiation, élongation, terminaison, coiffage, méthylation et polyadénylation

et deux protéines non structurales C et V qui jouent un rôle dans la transcription et la réplication virale.

Le génome viral est associé à 3 protéines virales N, P et L pour former la ribonucléoprotéine (RNP) qui constitue la structure minimale essentielle pour la transcription et la réplication du génome viral dans le cytoplasme cellulaire (figure 32).



**Figure 31** : Schéma de la structure de Morbillivirus (d'après Diallo)

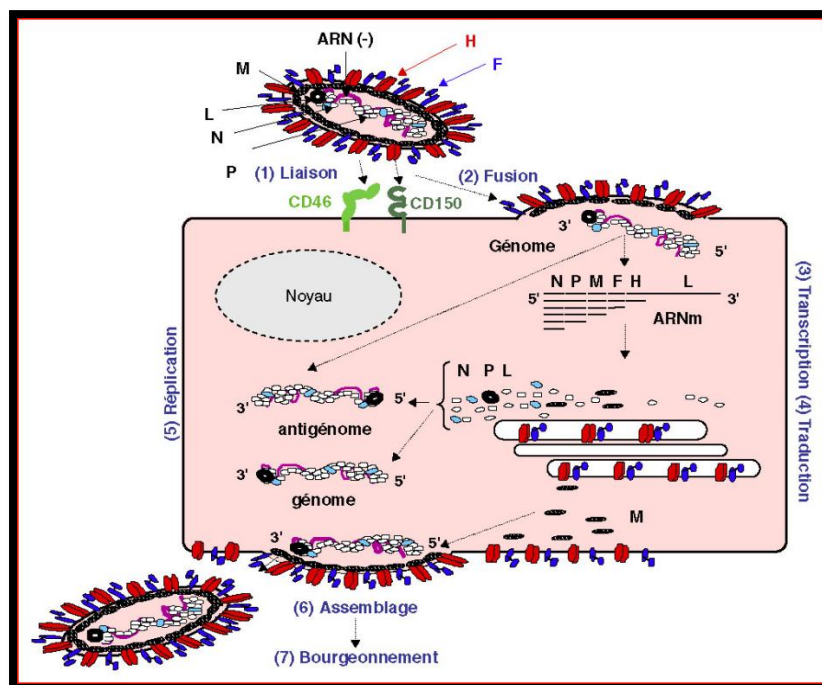
### V.3.2. Cycle viral

Le cycle viral est engagé suite à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule infectée. Simultanément deux phases sont activées : la transcription et la réplication. Ces deux phases sont contrôlées par deux régions non codantes situées aux extrémités 3' et 5' du génome, le *leader* et le *trailer*. Le *leader* (positions 1 – 54) et la partie 3' non codante de la N (positions 55 – 107) constituent le promoteur génomique (107 bases), utilisé par la polymérase virale pour la synthèse des ARNm. La partie 5' non codante de la polymérase L (positions 15840 – 15908) et le *trailer* (15909 – 15948) constituent le promoteur antigénomique (109 bases), utilisé par la polymérase pour la synthèse de l'ARN (+), intermédiaire de réplication du génome viral. Le *leader* et le *trailer* ont des séquences inversées complémentaires sur leurs 16 premières bases qui constituent probablement le signal de reconnaissance pour la polymérase virale.

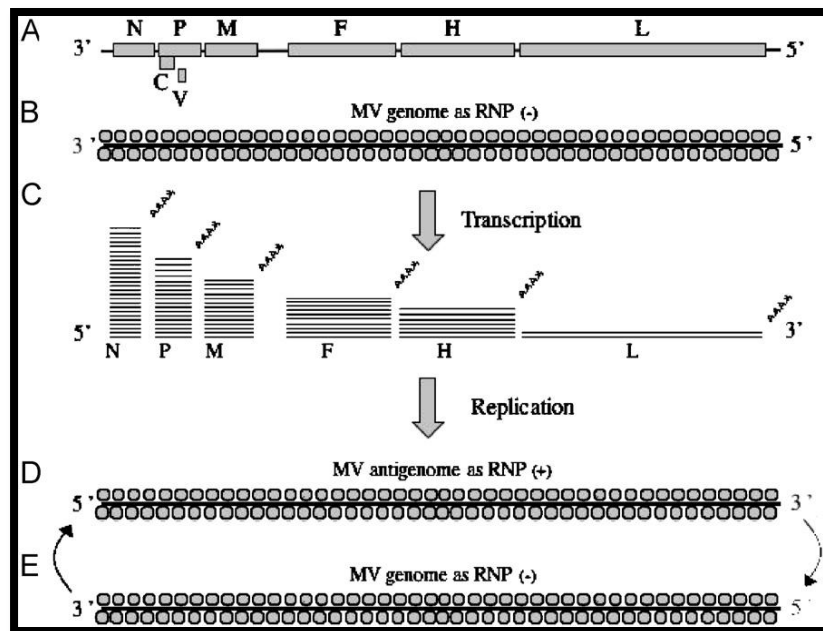
Grâce au complexe RNP, la transcription du génome viral est initiée. L'ARN synthétisé est décroché à chaque séquence inter génique qui constitue le signal de pause pour la polymérase. Ce mode de transcription aboutit à la synthèse d'ARNm monocistroniques traduits en protéines par la cellule hôte. Les séquences inter géniques sont très conservées chez les morbillivirus. Elles sont dites séquences d'atténuation de la synthèse d'ARN. Une des conséquences du phénomène d'atténuation est l'existence d'un gradient dans la quantité des ARN transcrits. Au cours du cycle viral (figures 32 et 33), la transcription fait progressivement place à la réplication qui consiste en la synthèse complète de génomes viraux. Les signaux tri nucléotides atténuateurs ne sont plus reconnus par la polymérase, qui



ne relâche l'ARN synthétisé qu'à la fin de la copie complète du génome, aboutissant ainsi au brin d'ARN(+) complémentaire entier. Cet antigénome est ensuite répliqué pour produire un génome de polarité négative. La transition entre la transcription et la répllication dépend de l'accumulation des protéines N et P. Ces protéines vont se lier à l'ARN en cours de synthèse par la polymérase ce qui va aboutir à de nouvelles RNP virales. Celles-ci, grâce à l'affinité des protéines N et M, vont migrer vers la membrane cellulaire où sont insérées les glycoprotéines virales d'enveloppe F et H. L'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe et les RNP permet la formation de bourgeons qui croissent pour finalement se détacher de la cellule cible et donner naissance à un virion complet dans le milieu extérieur.



**Figure 32** : Représentation schématique du cycle viral des morbillivirus



**Figure 33 :** Transcription et réplication d'un modèle de morbillivirus: le virus de la rougeole.(A) carte génomique du virus, (B) présentation schématique de l'ARN viral, (C) les transcrits d'ARN viraux (50-30 mRNAs) avec mise en évidence d'un gradient concernant ces transcrits, (D–E) étapes de réplication génomique montrant la matrice antigénomique (50-30 RNP) et la nouvelle séquence génomique produite (30-50 RNP).

## V.4. Physiopathologie

### V.4.1 Interactions virus et cellules

L'infection de la cellule cible commence par l'interaction des spicules de la glycoprotéine H avec son ligand cellulaire (Diallo *et al.*, 2003). Deux protéines cellulaires ont été identifiées comme récepteur permettant la fixation du virus de la rougeole (MV). Comme pour le virus de la rougeole ou de la peste bovine, le ligand naturel du virus PPR est probablement le CD150 (surface leukocyte adhesion molecule) ou SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule). Ce premier récepteur cellulaire utilisé par les morbillivirus est exprimé à la surface des lymphocytes activés, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques matures (Bodjo *et al.*, 2007 ; Tatsuo *et al.*, 2002). Le second récepteur est le récepteur CD46, initialement décrit comme un composant du système de régulation de l'activité du complément (Liszewski *et al.*, 1991), il est utilisé par les souches vaccinales du virus de la rougeole, adaptées à la culture cellulaire (Erlenhofer, *et al.*, 2002, Manchester *et al.*, 2000).

Une fois le virus lié à la cellule par le pont H-CD150, la protéine virale de fusion F intervient pour permettre la fusion des deux membranes virale et cellulaire. A la suite de ce processus de fusion, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte et le cycle viral se

déclenche. La multiplication du virus entraîne la mort et la lyse de la cellule. Grâce au complexe RNP, la transcription du génome viral est initiée. La polymérase ARN dépendante de l'ARN s'accroche au promoteur génomique de l'extrémité 3' du génome viral et entame la synthèse d'ARN. A chaque séquence inter génique constituée de trois nucléotides, il existe un signal de pause pour la polymérase lors de la transcription, l'ARN synthétisé est décroché avant que l'enzyme n'entame la copie du gène suivant. Ce mode de transcription aboutit à la synthèse d'ARNm monocistroniques traduits en protéines par la cellule hôte. De temps en temps, des molécules de polymérase ne « respectent » pas une ou deux pauses inter géniques, ce qui aboutit à la synthèse d'ARNm bi ou tricistroniques, produits aberrants de la transcription. Les séquences inter géniques sont très conservées chez les morbillivirus : CUU, CUA, CAA ou CUA. Pour le PPRV, cette séquence est CUU. Elles sont dites séquences d'atténuation de la synthèse d'ARN. Elles ne sont reconnues comme signal de pause ou d'atténuation que lors de l'étape de transcription et ne sont pas copiées. Une des conséquences du phénomène d'atténuation, en plus de la synthèse d'ARNm mono, bi et tri-cistroniques est l'existence d'un gradient dans la quantité de ces produits car il n'y a qu'un seul point d'entrée de la polymérase, le promoteur génomique pour la transcription. En raison de cette organisation génomique, plus un gène est éloigné du promoteur, moins il est transcrit. Autrement dit c'est l'ARNm N qui est le plus produit et l'ARNm L le moins produit. L'agencement des gènes dans le génome viral correspond à la proportion relative de chaque protéine nécessaire à la production du virus, N étant la protéine la plus abondante dans le virion et L la moins représentée.

#### V.4.2 Eléments de pathogénie

Les infections à Morbillivirus entraînent des maladies aiguës avec des taux de mortalité élevés. Le virus de la peste des petits ruminants se caractérise par un double tropisme, épithéliotrope (Diallo *et al.*, 2003) et lymphotrope. Ceci explique la nature et l'étendue des lésions causées par le virus de la PPR. L'infection virale emprunte généralement la voie respiratoire et le virus commence sa multiplication dans les organes lymphoïdes régionaux de l'hôte. Les virions néoformés dans le système lymphoïde local sont ensuite disséminés par voie sanguine dans le reste de l'organisme avec un tropisme particulier pour le système immunitaire et les muqueuses. Cette dissémination massive virale conduit à la destruction des cellules du système immunitaire et entraîne une sévère immunodépression à l'origine d'infections secondaires opportunistes. Il est à noter qu'en fonction de la virulence de la souche, le tropisme peut varier et être réduit voir même absent pour les souches atténuées

(Wohlsein *et al.*, 1995). D'autre part, l'espèce, la race et l'âge de l'animal influent sur l'expression de la maladie. D'autres infections, notamment bactériennes, peuvent intervenir dans la sévérité des signes cliniques. En cas de guérison, une immunité de longue durée s'installe.

## **V.5. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques**

La peste des petits ruminants peut se développer sous quatre formes cliniques en fonction de la sensibilité de l'animal atteint :

**-la forme suraiguë** : elle affecte principalement les caprins de plus de quatre mois. Après une incubation de trois jours, la maladie se traduit par une forte hyperthermie qui s'accompagne d'une congestion des muqueuses buccales et oculaires. L'animal est abattu et ne mange plus. Un à 2 jours après l'hyperthermie, apparaissent les larmolements et le jetage spumeux. La mortalité survient dans 100% des sujets atteints suite à une diarrhée profuse avec complications digestives 5 à 6 jours en moyenne après le début des symptômes (figure 34).

**- la forme aiguë** : elle reproduit modérément les mêmes symptômes de la forme suraiguë sur une période plus étalée. Environ 4-5 jours après le début de la maladie, la fièvre commence à diminuer et laisse place à la diarrhée et aux érosions de la muqueuse buccale avec ulcères hémorragiques. L'animal fatigué par la diarrhée reste couché indifférent à son entourage. Chez les femelles, du pus et des lésions érosives sont visibles sur les muqueuses vulvovaginales. L'avortement est de règle. Dans cette forme clinique, certains animaux peuvent résister à l'évolution fatale et guérissent rapidement, une semaine au plus. Néanmoins, la mortalité reste toujours importante. Elle s'élève à 70-80% et la mort survient 10 jours en moyenne après le début de l'hyperthermie.

**- la forme subaiguë** : elle se traduit par des signes cliniques peu intenses, voire absent. La phase d'incubation dure environ 5 jours comme pour la forme aiguë mais l'hyperthermie est faible. Dans le cas de jetage, le jetage est peu abondant et se dessèche autour des naseaux pour former des croûtes qui peuvent être confondues avec l'ecthyma contagieux.

**-la forme inapparente** : elle est la plus fréquente et sévit essentiellement notamment dans les zones sahéliennes et ne peut être révélée que lors des enquêtes sérologiques.

A l'autopsie, les lésions les plus fréquentes sont les ulcères des muqueuses buccales et génitales (figures 35 et 36). Des lésions congestives sont notées au niveau de l'intestin grêle, du colon et surtout du rectum où elles sont parfois hémorragiques.



**Figure 34** : Jetage mucopurulent (cliché A. Diallo)



**Figure 35** : Lésions nécrotiques sur la langue d'une chèvre (cliché A. Diallo)



**Figure 36** : Lésions nécrotiques sur la muqueuse buccale (clichés A. Diallo)

#### **V.6. Diagnostic de l'infection par le virus de la PPR**

La PPR fait partie des maladies de l'ex Liste A de l'OIE dans laquelle sont regroupées les maladies très contagieuses et à des conséquences économiques importantes. La PPR peut se confondre avec plusieurs maladies des petits ruminants telles que l'ecthyma contagieux, la pleuropneumonie contagieuse caprine, la pasteurellose ou la peste bovine. Un diagnostic de laboratoire est donc nécessaire pour distinguer ces maladies.

En cas de suspicion de la peste des petits ruminants, différents types de prélèvements peuvent être réalisés afin d'isoler et d'identifier le virus : à partir des animaux vivants (sang total, écouvillonnages oculaires et nasaux) et sur les cadavres d'animaux (échantillons d'intestin, de poumon et de noeuds lymphatiques).

### ***Identification du virus***

L'identification du virus dans les prélèvements est réalisée par des méthodes classiques de diagnostic de laboratoire (Diallo *et al.*, 1995). L'immunodiffusion en gélose est une technique facile à mettre en œuvre et qui donne des résultats rapides sous 48 heures. Cependant, elle est peu sensible et peut mener à des erreurs de diagnostic entre la peste bovine et celle des petits ruminants (Diallo *et al.*, 1995). Les techniques d'immunofluorescence sont spécifiques avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Le test d'hémagglutination est une méthode rapide de détection des anticorps dans le prélèvement qui permet de différencier la peste bovine et de la peste des petits ruminants, car le virus de la peste bovine ne possède pas la propriété d'agglutination des globules rouges. Le test ELISA d'immunocapture (Libeau *et al.*, 1994), basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, est une méthode rapide et sensible pour un diagnostic différentiel entre les deux pestes des ruminants. La PCR (Polymerase Chain Reaction), extrêmement sensible est la technique la plus utilisée à l'heure actuelle, rapide, sensible et spécifique (Diallo *et al.*, 2003 ; Forsyth & Barret, 1995). Elle est basée sur l'amplification de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par transcription inverse de l'ARN viral extrait des échantillons. L'amplification est réalisée avec des amorces propres à chaque virus ce qui permet d'obtenir un résultat spécifique (Diallo *et al.*, 2003 ; Ozhul *et al.* 2002 ; Tufan *et al.*, 2006). Cette technique a été validée sur des prélèvements effectués sur des papiers buvards imbibés du sang de l'animal à tester (Michaud *et al.*, 2007)

L'isolement viral reste le diagnostic de référence. Il permet de créer une banque de souches référencées. Cet isolement est réalisé sur des cellules de lignées primaires (cellules de rein ou de poumon de mouton pour la PPR) ou sur des cellules Vero (cellules de rein de singe vert). Depuis plusieurs années, des cellules exprimant le récepteur CD150 à leur surface sont

utilisées pour l'isolement et la multiplication des morbillivirus, notamment pour le CDV, MV et RPV (Tatsuo *et al.*, 2001 ; Tatsuo *et al.*, 2002 ; Lan *et al.*, 2006). Le virus isolé est mis en évidence par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux spécifiques.

### ***Tests sérologiques***

D'autre part, l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) a instauré, dans le cadre d'échanges internationaux d'animaux, le diagnostic sérologique. Deux types de tests peuvent être utilisés pour cette fin : la technique de séroneutralisation, technique assez lourde qui ne peut être utilisée en routine nécessitant des cultures cellulaires et avec un rendu de réponse allant jusqu'à 10 jours (Rossiter *et al.*, 1985) et les tests ELISA de compétition (Libeau *et al.*, 1992 ; Libeau *et al.*, 1994) qui sont basés sur l'utilisation d'anticorps anti-N ou anti-H de la PPR, ces derniers ayant une meilleure spécificité et une moins bonne sensibilité. Cependant, aucun de ces tests ne permet d'effectuer une distinction systématique entre anticorps anti-Peste bovine et anti-PPR.

## **V.7. Traitement et prophylaxie**

### ***Prophylaxie sanitaire***

Il n'existe pas de traitement spécifique contre la peste des petits ruminants. L'antibiothérapie n'assure que la prévention contre les infections respiratoires qui peuvent se rajouter à l'état de l'animal déjà atteint. En pays indemne, l'importation d'animaux sensibles en provenance de pays infectés doit être strictement interdite. Dans les pays d'enzootie, les foyers déclarés doivent être éliminés rapidement, en interdisant la sortie des animaux. Ainsi, le contrôle de la PPR repose essentiellement sur des mesures sanitaires et préventives.

On dénombre, six principales mesures sanitaires à appliquer lors d'apparition de foyers de PPR :

- Isolement des troupeaux infectés et des animaux malades au moins durant 45 jours
- En cas de foyers circonscrits en zone indemne, la solution la plus rapide et efficace reste l'abattage et la destruction des cadavres des animaux infectés
- Incinération des carcasses et des produits dérivant des animaux infectés
- Mise en quarantaine des animaux avant introduction dans le troupeau
- Contrôle des animaux et des véhicules

Ces mesures permettent de recouvrer le statut indemne en quelques mois mais supposent l'existence d'un système de surveillance clinique passive efficace permettant de détecter les premiers foyers en un temps relativement court. Lorsque l'infection a eu largement le temps de diffuser, seule la vaccination massive peut être envisagée.

### ***Prophylaxie médicale***

La prophylaxie préventive est basée essentiellement sur la vaccination. Sur le marché vétérinaire, plusieurs types de vaccins sont mis en pratique pour contrôler et prévenir contre la peste des petits ruminants. Succinctement, nous allons présenter des exemples de ces outils prophylactiques.

Devant l'échec de vaccins à virus inactivés et des premiers travaux sur l'atténuation des souches de PPR sur cultures cellulaires, le vaccin contre la peste bovine a longtemps été utilisé contre la peste des petits ruminants en raison des communautés antigéniques entre les deux virus (immunisation hétérologue). Cette utilisation est maintenant proscrite en raison du risque d'interférence avec le dépistage sérologique pour la surveillance de la peste bovine (Lefèvre, 2003). Pour la protection des petits ruminants contre la PPR, il existe désormais des vaccins homologues atténués par passages successifs en culture cellulaire. Il existe plusieurs souches vaccinales, PPR Nigeria 75/1 co-développée par le CIRAD et l'IAH de Pirbright (Diallo *et al.*, 1989b) ou deux souches d'origine indienne (Singh RP *et al.*, 2009), toutes générant une immunité durable d'au moins 3 ans après une seule injection, sur toute la durée de vie économique habituelle des petits ruminants (environ trois ans). Ils présentent un inconvénient majeur, leur sensibilité à la chaleur. Des essais de stabilisation thermique de ce vaccin ont été effectués et permettent d'étendre la durée de conservation du vaccin à des températures inférieures ou égales à 25°C (Sarkar *et al.*, 2003). D'autre part ces vaccins ne permettent pas de différencier entre les infectés et les vaccinés ; d'où la nécessité d'un vaccin DIVA pour le contrôle de la PPR. Alternativement, des vaccins recombinants ont été développés. Ils sont thermorésistants et permettent de protéger contre plusieurs agents pathogènes. Des vaccins capripoxviraux recombinants pour les 2 glycoprotéines de surface H et F ont été produits et ont montré leurs effets protecteurs avec des doses minimales protectrices aussi faibles que 10 doses et 0.1 dose TCID<sub>50</sub> respectivement (Diallo *et al.*, 2002, Berhé *et al.*, 2003).



## CADRE ET OBJECTIFS

## CADRE ET OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est de contribuer au développement d'un vaccin de « nouvelle génération » permettant de protéger les animaux et plus particulièrement les petits ruminants à la fois contre la fièvre de la Vallée du Rift (FVR), la peste des petits ruminants (PPR) et la variole des ruminants. Les 2 premières pathologies partagent la même distribution géographique, avec une incidence clinique élevée sur les ruminants et une forte contagiosité. Ces deux maladies ont un fort impact socio-économique dans les pays où elles sévissent et la fièvre de la Vallée du Rift est en outre une zoonose responsable de syndromes grippaux chez l'homme pouvant évoluer en encéphalite ou syndrome hémorragique léthal dans 1 à 2 % des cas. La variole des petits ruminants est présente dans la plupart des zones où sévissent la FVR et la PPR, avec une présence endémique au Maghreb. Une vaccination contre la variole est en place dans ces pays. Les trois maladies sont réputées contagieuses en France (MRC) et à déclaration obligatoire pour l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE).

Dans le but d'établir, la situation épidémiologique vis-à-vis de la FVR et de la PPR en Tunisie, et ainsi estimer l'intérêt que pourrait avoir un vaccin trivalent, une enquête sérologique permettant d'évaluer les niveaux de séroprévalence pour ces 2 maladies a été réalisée en Tunisie en 2006-2007 (Partie II).

Afin de répondre au principal objectif de ce travail, une stratégie de vaccins vectorisés a été envisagée et le modèle du vecteur capripoxvirus et plus précisément celui du virus de la dermatose nodulaire contagieuse a été choisi. Ce virus a, par ailleurs, déjà fait ses preuves comme vaccin recombinant contre la PPR et la fièvre catarrhale ovine (FCO) respectivement (Diallo *et al.*, 2002; Berhé G. *et al.*, 2003 ; Perrin *et al.*, 2007). Les vecteurs poxviraux recombinés sont utilisés dans des vaccins commerciaux développés pour certaines pathologies. Plusieurs exemples en témoignent tels que le fowlpoxvirus recombinant exprimant la protéine H5 du virus de l'influenza aviaire (vaccin commercialisé par Merial) (Bublot, *et al.*, 2006) ; le canarypoxvirus utilisé contre le virus de l'influenza équine et la fièvre du Nil occidental (vaccin commercialisé par Merial) (Minke *et al.*, 2004b) ; le virus de la vaccine recombinant exprimant la protéine G du virus de la rage (vaccin commercialisé par Merial) (Mackowiak *et al.*, 1999).

L'élaboration d'un vaccin capripoxvirus double recombinant FVR-PPR relève d'un triple intérêt :

- elle constitue une nouvelle approche pour étudier la capacité du vecteur capripoxvirus à protéger contre un nouveau transgène dérivé du virus de la FVR.
- elle permet d'évaluer la protection conférée contre trois maladies, par le vecteur capripox intégrant deux valences par recombinaison homologue dans 2 sites d'insertion distincts
- elle ouvre la perspective d'un vaccin thermostable, aspect non négligeable pour son utilisation dans les pays du Sud, pouvant conférer une protection après 1 seule administration sans rappel

L'identification de gènes conservés et immunogéniques pouvant induire une immunité protectrice avec la production d'anticorps neutralisants spécifiques chez l'animal est un des points clefs de la stratégie suivie. Des travaux récents ont permis de cibler sur les glycoprotéines  $G_N G_C$  du gène M de la FVR et sur le gène H de la PPR (Berhé G. *et al.*, 2003 ; Wallace *et al.*, 2006) . Notre objectif était donc d'évaluer la capacité de notre vecteur de type capripoxvirus à induire une réponse immunitaire contre ces gènes cibles et à évaluer cette réponse dans des essais de protection après une épreuve virulente ou non chez les animaux sensibles à la FVR et à la PPR. Le développement des vaccins poxviraux recombinants contre la FVR et la PPR nécessite plusieurs étapes à savoir l'élaboration des constructions plasmidiques et leur validation *in vitro* (Partie III-Chapitre 1). En raison de difficultés techniques rencontrées au cours de ce travail, seule l'évaluation de l'effet protecteur et des réponses immunitaires engendrés par un capripoxvirus simple recombinant pour la FVR a pu être réalisée et est détaillée dans le chapitre 2 de la Partie III de ce manuscrit.

## **PARTIE II : ENQUETE SEROEPIDEMIOLOGIQUE**

### **PPR ET FVR EN TUNISIE**

## **Partie II : Enquête séroépidémiologique PPR et FVR en Tunisie**

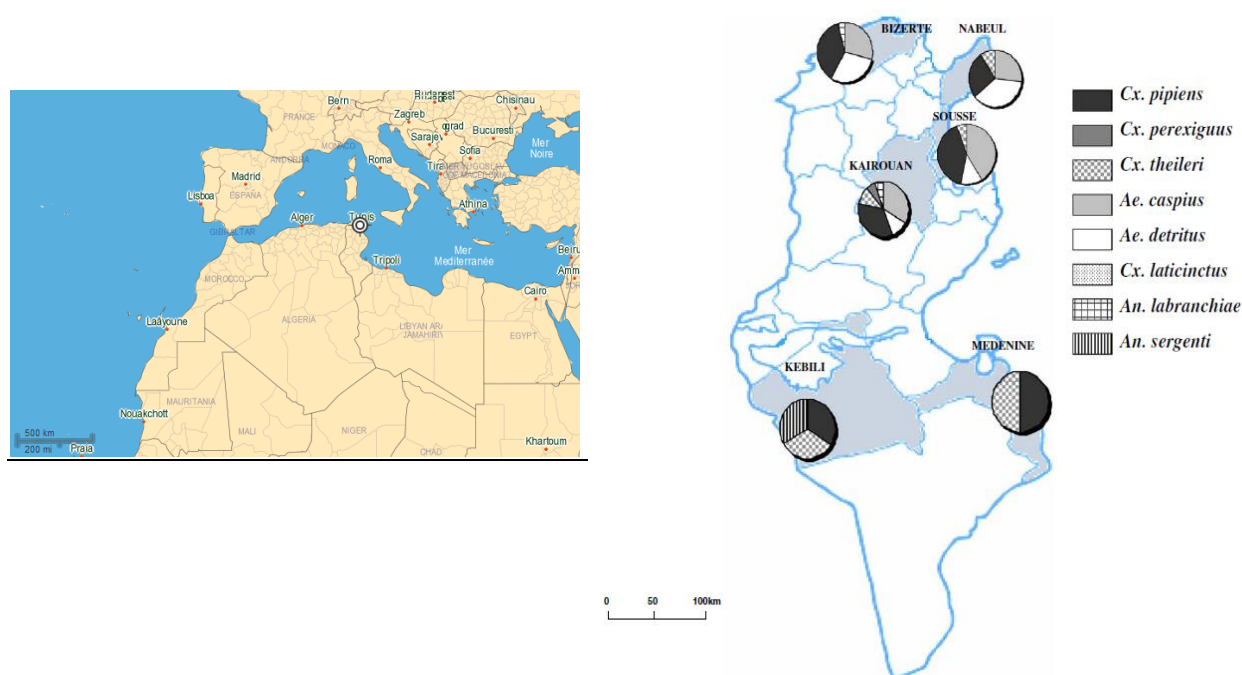
Cette enquête de séroprévalence a été réalisée pour la première fois en Tunisie. Elle a pour objectif de dépister une éventuelle circulation virale des virus de la fièvre de la vallée de rift et de la peste des petits ruminants afin d'évaluer l'impact que pourrait avoir l'utilisation d'un vaccin double recombinant sur un tel territoire. Ce pays d'Afrique du Nord présente un statut sanitaire enzootique en matière de capripoxviroses et ceci malgré les campagnes de vaccination annuelle. D'autre part, le positionnement géographique de la Tunisie dans le bassin méditerranéen sa situation et par rapport aux pays limitrophes, lui confère une prédisposition à l'atteinte par de nouvelles pathologies telles les deux exemples choisis dans ce travail. Le cas de la fièvre catarrhale ovine et notamment du sérotype 2 en est une bonne illustration également (Purse *et al.*, 2005). Les travaux présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication, présentée en Annexe 1 de ce manuscrit : Ayari-Fakhfakh E., Ghram A., Bouattour A., Larbi I., Gribâa-Dridi L., Kwiatak O., Bouloy M., Libeau G., Albina E., Cêtre-Sossah C., 2011, First serological investigation of peste-des-petits-ruminants and Rift Valley fever in Tunisia. *Veterinary Journal* 187 (3) : 402-4.

### **1- Matériel et Méthodes**

L'enquête sérologique réalisée est de type transversal. Elle a été menée sur une période de 5 mois comprise entre Septembre 2006 et Janvier 2007.

#### *1.1. Les régions d'échantillonnage*

Six régions réparties sur l'ensemble du pays ont été sélectionnées. Ce choix a été fait en fonction de leur forte densité animale, de la présence en abondance des gîtes de vecteurs et de l'existence de zones marécageuses, tout ceci favorisant des zones écologiques variées en fonction des régions choisies. Il a été également conduit sur des régions frontalières avec les pays avoisinants. Ces sites de prélèvements sont représentés sur la carte suivante (figure 37).



**Figure 37 :** a. Carte du monde représentant la position de la Tunisie dans le bassin méditerranéen, b. Carte de Tunisie présentant les 6 régions échantillonnées (couleur grise) avec la distribution des différentes espèces de moustiques identifiées

### 1.2. Les animaux testés

Les animaux appartiennent à des élevages traditionnels de type extensif. Ce sont des grands et petits ruminants ainsi que des camélidés, tous prélevés au hasard, généralement à proximité de zones d'abreuvement. Le nombre total d'échantillon obtenu est de 610 animaux. Cet échantillonnage est représenté en fonction de l'espèce et de la région dans le tableau suivant (tableau 4).

### 1.3. Les sérums

Les sérums sont obtenus à partir de prélèvements sanguins réalisés au niveau de la veine jugulaire de chaque animal. Le sang est récolté dans un tube sec et stérile où il sera maintenu à température ambiante pour favoriser la coagulation. La récolte du sérum s'effectue après la formation du caillot et par centrifugation à 3000 tours/mn pendant 10 minutes.

	Total	OVINS	CAPRINS	BOVINS	CAMELIDES	Mosquito species	%
Bizerte	93 (13550)	44 (6000)	0 (1500)	49 (6050)	0 (0)	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>An. labranchiae</i>	29 29 38 4
Kairouan	191 (118300)	76 (102300)	33 (9000)	82 (7000)	0 (0)	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i> <i>Cx. perexiguus</i> <i>Cx. laticinctus</i>	33,5 11 33,5 11 5,5 5,5
Kébili	76 (30340)	21 (14500)	27 (13800)	0 (110)	28 (1930)	<i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i> <i>An. sergenti</i>	33,5 33,5 33
Médenine	8 (181930)	0 (130000)	1 (50000)	0 (230)	7 (1700)	<i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i>	50 50
Nabeul	175 (64890)	67 (39980)	49 (7430)	59 (17480)	0 (0)	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i>	26 36 26 9
Sousse	67 (112400)	55 (103500)	9 (7300)	3 (1600)	0 (0)	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i>	41.5 11.5 41.5 5.5
Total	610 (521410)	263 (396280)	119 (89030)	193 (32470)	35 (3630)		

**Tableau 4** : Répartition géographique des échantillons analysés (sérum et pièges). *Ae.* Correspond à *Aedes*, *An.* À *Anopheles*, et *Cx.* pour *Culex*. Le nombre présenté entre parenthèses correspond au nombre total d'animaux répertoriés dans les régions choisies.

#### 1.4. Tests sérologiques

La recherche d'anticorps dirigés contre la PPR et la FVR s'est faite par l'utilisation de tests ELISA indépendants. Les analyses ont été menées simultanément à l'Institut Pasteur de Tunis, l'Institut Pasteur de Paris et au CIRAD Montpellier.

La séroprévalence de la PPR a été évaluée par l'utilisation d'un test ELISA compétitif utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la nucléoprotéine N du virus PPR. Le protocole est décrit dans l'article de Libeau *et al.*, 1995. Un total de 263 sérums ovins et 119 sérums caprins ont pu être testés.

Concernant la recherche d'anticorps anti-FVR, les tests ELISA ont été effectués sur la totalité des prélèvements. Le test utilisé est le test ELISA de compétition développé par Paweska *et al.*, 2005 et commercialisé par BDSL ([www.bdsl2000.com](http://www.bdsl2000.com))

#### 1.5. Tests Statistiques

Le logiciel Winepiscopo a permis de réaliser l'analyse statistique des résultats sérologiques (De Blas *et al.* 2000).

Avant d'aborder les résultats, nous soulignons qu'au cours de cette enquête, nous avons essayé de détecter l'ADN viral du virus de la PPR à partir de 28 prélèvements pulmonaires (25 ovins et 3 caprins) prélevés aléatoirement, issus de différents abattoirs. Une RT-PCR mise au point par Couacy-Hymann a été utilisée à cette fin (Couacy-Hymann *et al.*, 2009).

## 2. Résultats

La prévalence totale obtenue pour la PPR est de 7,6% (IC : 4.9–10.1 avec une précision de 95%). Ces résultats sont soutenus par une spécificité de 99.4% et une sensibilité de 94.5% du



test ELISA utilisé (Libeau *et al.*, 1995). Les deux régions, Kairouan (95%, IC 8.7–22.3) et Kébili (95%, IC 3.1–20.9) sont les plus atteintes en terme de séroconversion (tableau 4). La différence de séroprévalence entre les ovins (5.7%) et les caprins (11.8%) est statistiquement significative ( $X^2 = 4.3$ ,  $d.f. = 1$ ,  $P = 0.04$ ). Les 28 échantillons de poumons testés par RT-PCR n'ont révélé aucune amplification spécifique.

La détection d'une circulation virale pour la FVR n'a conduit à aucun résultat positif malgré la présence de plusieurs genres et espèces de moustiques potentiellement vecteurs (tableau 5; figure 37) (Moutailler *et al.*, 2008). Selon le logiciel statistique Winepiscope pour avoir au moins 1% de prévalence il faut disposer d'un échantillonnage supérieur ou égal à 527 (De Blas *et al.* 2000). Cette condition est respectée puisque pour le cas de la FVR, 610 sérums ont été testés. L'ELISA utilisé présente une sensibilité de (99–100%) (Paweska *et al.* 2005).

L'espèce *Culex (Cul.) theileri* est présente dans tous les sites piégés sauf celui de Bizerte. Deux espèces d'anophèles (*An. sergenti* et *An. labbranchiae*) ont été identifiées en faible densité à Kébili et Bizerte respectivement. Quelques larves de *Culex perexiguus* et *Cul. laticinctus* ont été détectées à Kairouan.

	Total Nb of animals/Positive animals (%SP)	Total Nb of Sheep/ Positive sheep(%SP)	Total Nb of Goats / Positive goats (%SP)
Bizerte	44/3 (6.8)	44/3 (6.8)	0/0 (0)
Kairouan	109/17 (15.6)	76/8 (10.5)	33/9 (27.3)
Kébili	48/6 (12.5)	21/2 (9.5)	27/4 (14.8)
Médénine	1/1 (*)	0/0 (0)	1/1 (*)
Nabeul	116/1 (0.9)	67/1 (1.5)	49/0 (0)
Sousse	64/1 (1.6)	55/1 (1.8)	9/0 (0)
Total	382/29 (7.6)	263 (15)	119 (14)
%	<b>7.6</b>	<b>5.7</b>	<b>11.8</b>

**Tableau 5:** Séroprévalence PPR (\*) non représentatif – SP signifie Seroprévalence.

3.

**En conclusion**, la recherche d'une séroprévalence FVR s'est révélée infructueuse, en revanche, un taux de 7.6 % de séroprévalence PPR a été observé chez des chèvres et ovins testés sur tout le territoire tunisien, les 2 régions de Kébili et de Kairouan étant les régions les plus touchées.

## **PARTIE III : DEVELOPPEMENT DE VACCINS CAPRIPOXVIRUS RECOMBINANTS EXPRIMANT**

**DIFFERENTS GENES DES VIRUS DE LA FVR ET DE LA  
PPR : EVALUATION DE L'IMMUNOGENICITE ET DE LA  
PROTECTION INDUITE *IN VIVO***

## Chapitre 1 - Elaboration et validation des constructions plasmidiques *in vitro*

Les techniques les plus couramment utilisées pour l'insertion de gènes rapporteurs au sein du génome des poxvirus sont basés soit sur une recombinaison homologue entre un plasmide de transfert et le génome du poxvirus (Mackett *et al.*, 1982; Piccini *et al.*, 1987) soit par ligation directe d'ADN (Timiryasova *et al.*, 2001). La technique qui a été utilisée au cours de ce projet est la technique de recombinaison homologue. Son principe est simple. Un plasmide de transfert est transfecté *in vitro* dans des cellules préalablement infectées avec une souche vaccinale atténuée de capripoxvirus, dans notre cas la souche KS-1. La cassette plasmidique est formée des deux parties flanquantes du site d'insertion choisi, du transgène et d'un marqueur de sélection, les deux étant sous le contrôle d'un promoteur choisi. La cotransfection abouti à une double recombinaison homologue entre la cassette du plasmide de transfert et l'ADN génomique viral du poxvirus au niveau du site d'insertion choisi. Dans notre cas, la cassette d'expression du plasmide de transfert s'intègre donc dans le gène de la thymidine kinase (TK) et le gène du récepteur à l'interleukine 8 (RIL-8), gènes non essentiels à la survie du capripoxvirus. Le taux d'évènements de recombinaison, dans les cellules infectées par les poxvirus, est relativement faible, environ 1 pour 10 000 (Franke *et al.*, 1985) et la quasi-totalité de la population de virus néoformés reste de type parentale c'est-à-dire non recombinants (Moss, 1992).

Une fois les virus recombinants générés, il est alors possible d'entrer dans une phase de purification de ces derniers en éliminant les virus non recombinants par pression de sélection. De multiples approches ont été explorées afin de faciliter l'élimination des virus non recombinants et ainsi l'isolation de virus recombinants purs:

- La sélection du phénotype négatif pour le gène de la thymidine kinase (TK-), est un moyen de sélection utilisé en routine pour la purification de recombinants basés sur le virus de la vaccine (Mackett *et al.*, 1984), mais ce moyen de sélection n'est pas aussi efficace que ce qui était attendu (Buller *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1991). En effet, l'inactivation du gène TK génère des virus recombinants instables (Wallace & Viljoen, 2002).
- L'utilisation d'un marqueur de sélection positif permettant une sélection par:
  - Coloration, comme la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -glucuronidase (GUS) (Chakrabarti *et al.*, 1985; Panicali *et al.*, 1986; Carroll & Moss, 1995).

- Fluorescence, grâce à la GFP (green fluorescent protein) (Dominguez *et al.*, 1998, Wallace *et al.*, 2007).
- La résistance à un antibiotique tel que la néomycine (Franke *et al.*, 1985; Katz & Middle, 1990), la puromycine (Sanchez-Puig & Blasco, 2000) ou l'acide mycophénolique, MPA (Falkner & Moss, 1988).
- Plus récemment, Hansen *et al.*, ont développé une enzyme bi fonctionnelle (Bizyme) qui permettrait une sélection plus simple et plus rapide des virus recombinants (Hansen *et al.*, 2002).

Malgré la quantité de marqueurs disponibles, très peu s'avèrent réellement efficaces. De plus, les marqueurs de sélection visuelle (GUS, GFP...) permettent une visualisation des virus recombinants mais n'exercent aucune pression de sélection sur les virus sauvages et ne permettent donc pas leur élimination. Les antibiotiques, tels que la néomycine ou la puromycine engendrent une forte mortalité cellulaire sur de nombreuses lignées cellulaires. Le gène de la guanosine phosphoribosyle transférase d'*Escherichia coli* (*Ecogpt*), qui code pour une résistance à l'acide mycophénolique, s'avère être une des méthodes, *a priori*, les plus efficaces et les plus couramment utilisées (Berhé *et al.*, 2003; Falkner & Moss, 1988; Romero *et al.*, 1993; 1994).

Ce chapitre décrira en première partie les moyens mis en œuvre pour l'obtention des plasmides de transfert ainsi que les difficultés rencontrées. La deuxième partie concernera l'élaboration des différents recombinants et leur validation à l'aide de plusieurs techniques.

# **1. Matériel et méthodes**

## **1.1. Virus et cellules**

Le virus utilisé pour la génération des recombinants est le capripoxvirus correspondant à la souche vaccinale Kenya Sheep - 1 (KS-1), isolée en 1974 (Davies, 1976) et atténuée par Kitching *et al.* (1987). Cette souche vaccinale, produite par l'Institute of Animal Health (IAH, Pirbright, Angleterre), a été obtenue, à partir de la souche virulente, après deux passages sur culture de cellules de testicules d'agneaux, deux passages sur culture de cellules de rein de bébé hamster (BHK21-Baby Hamster Kidney 21) et enfin quatre passages sur culture de cellules de reins d'agneaux.

La souche KS-1 est cultivée sur une lignée de cellules de testicules agneaux (OA3Ts, ATCC, CRL 6546) en milieu de Eagle modifié par Dulbecco, D-MEM (Gibco, USA) enrichi à 10 % en sérum de bovin fœtal (SBF). Les virus recombinants générés à partir de cette souche atténuée sont également cultivés sur ce type de cellules OA3Ts, en revanche le milieu de culture diffère par l'ajout d'agents de sélection.

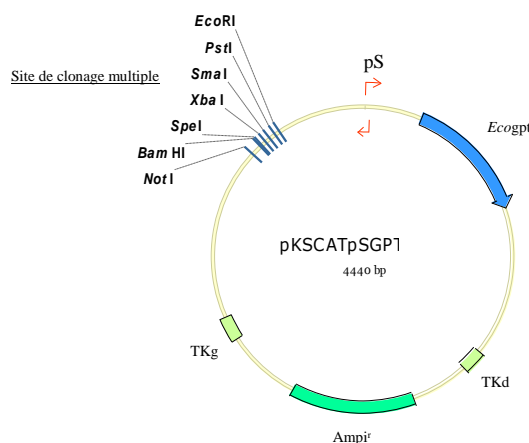
Le plasmide pTVT7-M fourni par le Dr. Michèle Bouloy (Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur de Paris), renferme le segment M codant pour les deux glycoprotéines  $G_2$  et  $G_1$  (renommée également  $G_N$  et  $G_C$ ) et le segment codant pour la protéine non structurale NSm de la souche virale du virus de la fièvre de la vallée du Rift ZH501. Au laboratoire, ce plasmide a été amplifié dans des bactéries *Escherichia coli* stbl3 chimio-compétentes (Stratagène, USA) puis purifié avec le kit Endofree plasmid maxi (Qiagen, USA). Un séquençage de vérification du segment M a été effectué en comparaison avec celui de la souche rift ZH548, avec un seul nucléotide qui diffère en position où une seule base diffère.

La souche sauvage Nigéria 84 du virus de la PPR a été amplifiée sur des cellules de reins de singe (Véro), en présence de milieu de Eagle modifié, MEM (Gibco, USA) enrichi à 5 % en SVF et 1% en L-glutamine. Cette souche est produite en laboratoire de confinement niveau 3. Le gène de l'hémagglutinine H du virus de la PPR a été amplifié à partir d'ARN extrait à partir de cette souche.

## 1.2. Construction des plasmides de transfert

### 1.2.1. Le plasmide de transfert pKSCATpSGPT

Les constructions finales résultent toutes du plasmide pKSCATpSGPT. Ainsi, à partir du plasmide le pBluescript II KS, le pKSCATpSGPT (plasmide souche Kenya Sheep, Capripoxvirus, gène de la Thymidine kinase, promoteur Synthétique, gène de la GPT), a été développé au CIRAD (Berhé *et al.*, 2003). Ce plasmide est conçu pour servir de cassette d'expression de transgènes au sein de la souche KS1. Il comporte un site de clonage MCS, le promoteur synthétique (pS) précoce/tardif du virus de la vaccine (Chakrabarti *et al.*, 1997), placé en « back to back » pour assurer à la fois le contrôle du gène d'intérêt et celui d'un marqueur de sélection des recombinants (Boyle & Coupar, 1988; Falkner & Moss, 1988) ; ce dernier concerne le gène de la xanthine-guanine phosphoribosyle transférase d'*Escherichia coli* (*Ecogpt*). La séquence du gène codant pour l'ampicilline se situe au niveau du siège de recombinaison TK (Dubbs, 1964; Wallace & Viljoen, 2005). Il constitue un marqueur de sélection positive pour les clones transformés suite au clonage du gène rapporteur (figure 38).



**Figure 38 :** Représentation schématique du plasmide de transfert pKSCATpSGPT, pS: promoteur synthétique; *Ecogpt*: gène de résistance; TKg: région flanquante côté 5' du gène de la thymidine kinase, TKd: Région flanquante côté 3' du gène TK; Amp<sup>r</sup>: résistance à l'ampicilline.

### 1.2.2. Amplification et clonage du gène H du virus de la PPR

L'ARN simple brin du virus de la PPR a été extrait à partir de 150 µl de surnageant de culture cellulaire de la souche sauvage vaccinale PPR 75 /1 à l'aide du kit Rneasy Min (Qiagen,

USA). Une amplification spécifique du gène H avec les amorces adéquates a été faite. Des travaux précédents les nôtres ont permis d'obtenir la construction du plasmide de transfert ou plasmide Navette nommé pKSCARIL8pSGPT-HPPR (plasmide Bluescript II KS, CAripoxvirus, gène RIL8, Promoteur Synthétique, gène de la GPT, gène HPPR), qui a été validée *in vitro* antérieurement. Elle concerne le gène H-PPR sous le contrôle de pS qui assure aussi l'expression du gène de sélection EcoGPT. Cet assemblage comprend deux régions flanquantes du site d'insertion choisi, le site RIL8.

### 1.2.3. Amplification et clonage des gènes G2/G1 du virus de la FVR

Pour l'expression des deux glycoprotéines G2 et G1 du virus Rift, plusieurs constructions ont été envisagées à partir du segment M. Ces dernières se basent d'une part sur les travaux de Suzich *et al.*, 1990 présentés dans la figure 39 qui portent sur les différents niveaux d'expression de G1 et G2 par rapport aux différents ATG de la polyprotéine NSmG2G1 et, d'autre part, sur les résultats d'immunogénicité de G1 et G2 (Keegan *et al.*, 1986). Finalement, ces réflexions ont conduit à différentes stratégies qui sont présentées dans la figure suivante. Ces différentes stratégies font appel soit à un sous-clonage (a) soit à un clonage direct (b) de ces inserts :

#### a) Sous clonage de l'Insert FVR dans le plasmide pKSCATpSGPT :

La stratégie 1 schématisée en figure 40 consiste en l'amplification du fragment NSmG2G1 (3600 pb) et du fragment G2G1 (3100 pb) à l'aide d'amorces spécifiques listées en annexe contenant les séquences du promoteur PIL1 en queue flottante (Cao *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2004). Le promoteur PIL1 a été choisi pour sa capacité d'expression élevée par rapport aux promoteurs utilisés classiquement (promoteur synthétique pS, promoteur p7.5, promoteur ATI) (C. Le Goff, communication personnelle). L'amplification et le clonage du fragment NSmG2G1 à partir du premier ATG correspond à une expression de 100% des deux glycoprotéines ainsi que de la protéine NSm (figure 39, Suzich *et al.*, 1990). Différents vecteurs commercialisés (pSCA, pSCB, pCR2.1, pCR et ZEROBlunt) (Invitrogen, USA) ont fait l'objet de multiples essais pour aboutir au clonage de ces deux inserts qui ont été envisagés aussi bien avec des extrémités cohésives qu'en bouts francs (Blunt), ceci pour favoriser toutes les possibilités d'insertion. Les plasmides ayant inséré le fragment NSmG2G1 ou le fragment G2G1 ont été transformés dans différentes souches de bactéries chimio-



compétentes d'*Escherichia coli* de (Stratagène, USA), adaptées au vecteur de clonage choisi. La réalisation d'une PCR avec les amorces pIL1 NSmGN Rift F et G1RiftR ont permis de sélectionner les clones positifs. L'ADN plasmidique de ces clones a été extrait avec le kit Endofree plasmid maxi (Qiagen, USA). Chaque insert cloné individuellement dans un ou plusieurs de ces plasmides (pSCA, pSCB, pCR2.1, pCR ZEROBlunt) sera par la suite sous cloné dans le site de clonage multiple MCS (MultiCloning Site) du plasmide de transfert pKSCATpSGPT.

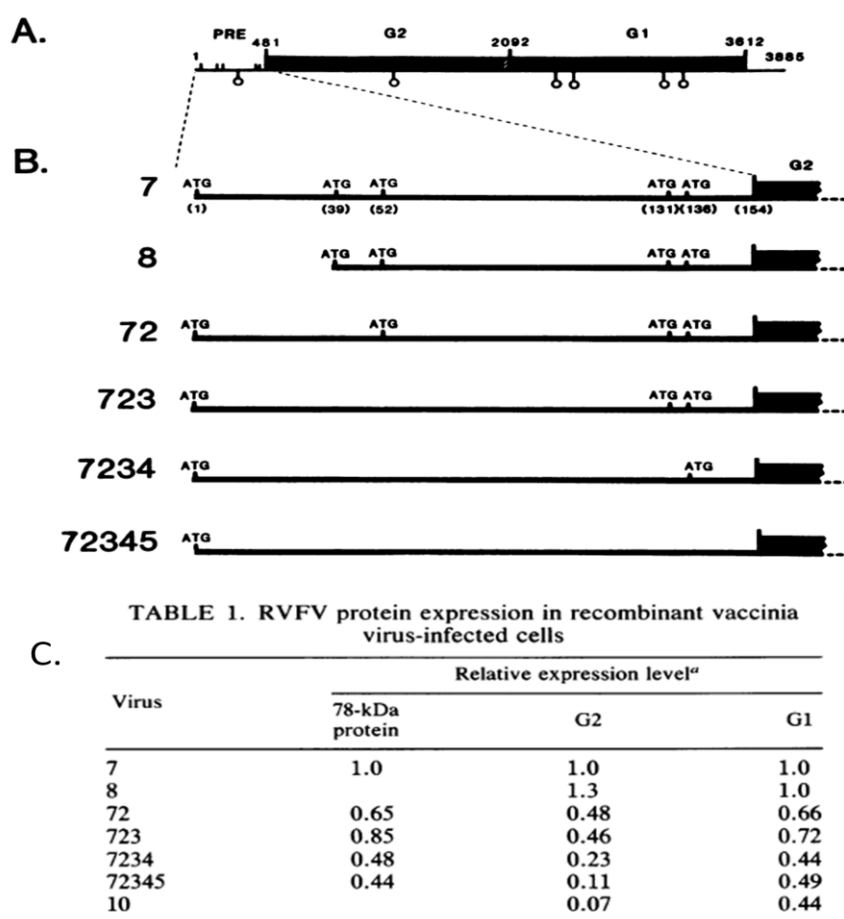
b) Clonage direct de l'Insert FVR dans le plasmide de transfert pKSCATpSGPT :

Les stratégies 2, 3 et 4 présentées en figure 40 consistent au clonage direct des inserts dans le plasmide navette pKSCATpSGPT au niveau du site de multiclonage (MCS).

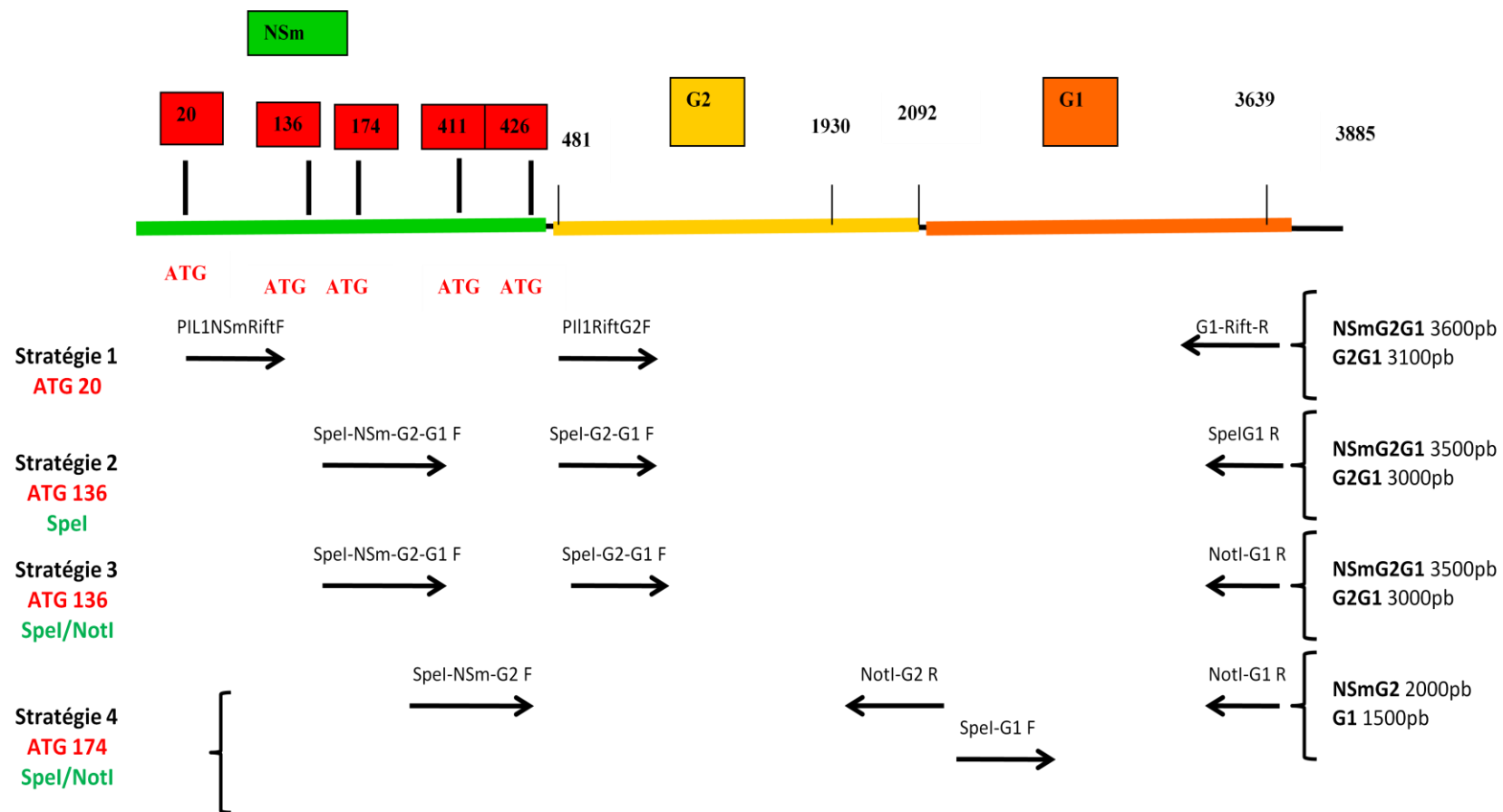
- Clonage dans le site de restriction SpeI (**stratégie 2**) : Les 2 inserts NSmG2G1 (3500pb) et G2G1 (3000pb) sont amplifiés à partir du Second ATG de la séquence (figure 39) par 2 nouveaux couples d'amorces SpeINSmG2G1F et SpeIG1R et SpeIG2G1F et SpeIG1R réciproquement où chacune des amorces comporte en 5' la séquence du site de clonage, SpeI (Annexe 1). L'existence et l'unicité du site ont été vérifiées par digestion enzymatique sur le plasmide de transfert utilisé pKSCATpSGPT.
- Clonage dirigé dans en SpeI / NotI (**stratégie 3**) : la démarche est semblable à la précédente avec le clonage du fragment NSmG2G1 (3500pb) à partir du 2ème ATG et du fragment G2G1 (3000pb). De nouveaux couples d'amorces, les amorces SpeINSmG2G1F/NotIG1R, et SpeIG2G1/ NotIG1R ont été définis pour l'amplification respective de ces fragments (Annexe 1). L'existence et l'unicité des sites SpeI et NotI ont été vérifiées sur le plasmide de transfert également.
- Détermination de nouveaux inserts pour l'expression des deux glycoprotéines G2 et G1 (**stratégie 4**) : Dans cette partie, notre réflexion a porté sur l'expression de G2 et G1 séparément en se basant sur les travaux de Collett réalisés en 1985 et qui comparent l'immunité conférée par ces deux glycoprotéines en soulignant l'importance de celle de G2. Ce choix a conduit donc à définir 2 nouveaux couples d'amorces avec les séquences des sites de restriction soit SpeI soit NotI : le couple SpeINSmG2/NotIG2R amplifiant l'insert, NSmG2 (2000pb) exprimé à partir du 3ème

ATG (174 pb) et le couple SpeIG1F /Not IG1R permettant d'amplifier l'insert G1 de 1500 pb (Annexe 1).

Les souches de bactéries testées pour les transformations réalisées dans les clonages provenant de ces 3 stratégies sont XL-10 Gold, Stbl3, stbl2, Topten 10, AbleK (Invitrogen, USA). Ce panel de bactéries a été choisi pour contourner les différentes difficultés de clonage qui réside dans l'instabilité des inserts par leur taille importante et leur forte composition en GC qui prête à la toxicité et donc à l'échec du clonage. Une PCR réalisée à partir des clones bactériens permet de sélectionner les clones ayant intégré le fragment souhaité. L'ADN plasmidique des clones positifs est extrait et purifié par le kit Endofree plasmid maxi (Qiagen, USA).



**Figure 39** : Séquences du gène M trouvées dans les virus recombinants élaborés à partir de la vaccine, A. Représentation schématique du gène M de la FVR, B. Représentation des ATG, C. Taux d'expression en cellules infectées par les virus recombinants FVR-Vaccine (Suzich *et al.*, 1990).



**Figure 40:** Représentation schématique de l'organisation génique du segment M du virus de la FVR présentant les 4 stratégies de clonage entreprises

#### **1.2.4. Clonage du marqueur de sélection la généticine GNT ou G418**

Dans la conception envisagée pour la construction du capripoxvirus recombinant FVR-PPR, la cassette d'expression FVR doit se différencier de celle de la PPR par son marqueur de sélection l'Ecogpt, pour pouvoir permettre au double recombinant d'exercer une pression sélective contre les virus sauvages parentaux. Pour cela, le choix a porté sur le gène de la généticine G418, en tant que nouveau marqueur de sélection à la place de l'Ecogpt. Son insertion dans le plasmide de transfert pKSCATpSGPT est réalisée à l'endroit de l'Ecogpt, elle est orientée en XhoI/ApaI avec insertion du site XhoI créé par mutagenèse dirigée (QuikChange II Site-Directed *Mutagenesis Kit*, Agilent, USA). La généticine représentera le marqueur de sélection du double recombinant par rapport à l'Ecogpt qui ne pourra sélectionner que les simples recombinants FVR et PPR. Les bactéries chimio-compétentes d'*Escherichia coli* Topten10 ont contribué à l'amplification des clones positifs. Une PCR utilisant un couple d'amorces spécifiques au gène codant pour la G418 (Annexe 1) a été mise au point pour mettre en évidence la présence de l'insert au sein des colonies.

### **1.3. Elaboration des capripoxvirus recombinants FVR**

#### **1.3.1. Validation de l'expression *in vitro* des capripoxvirus recombinants FVR**

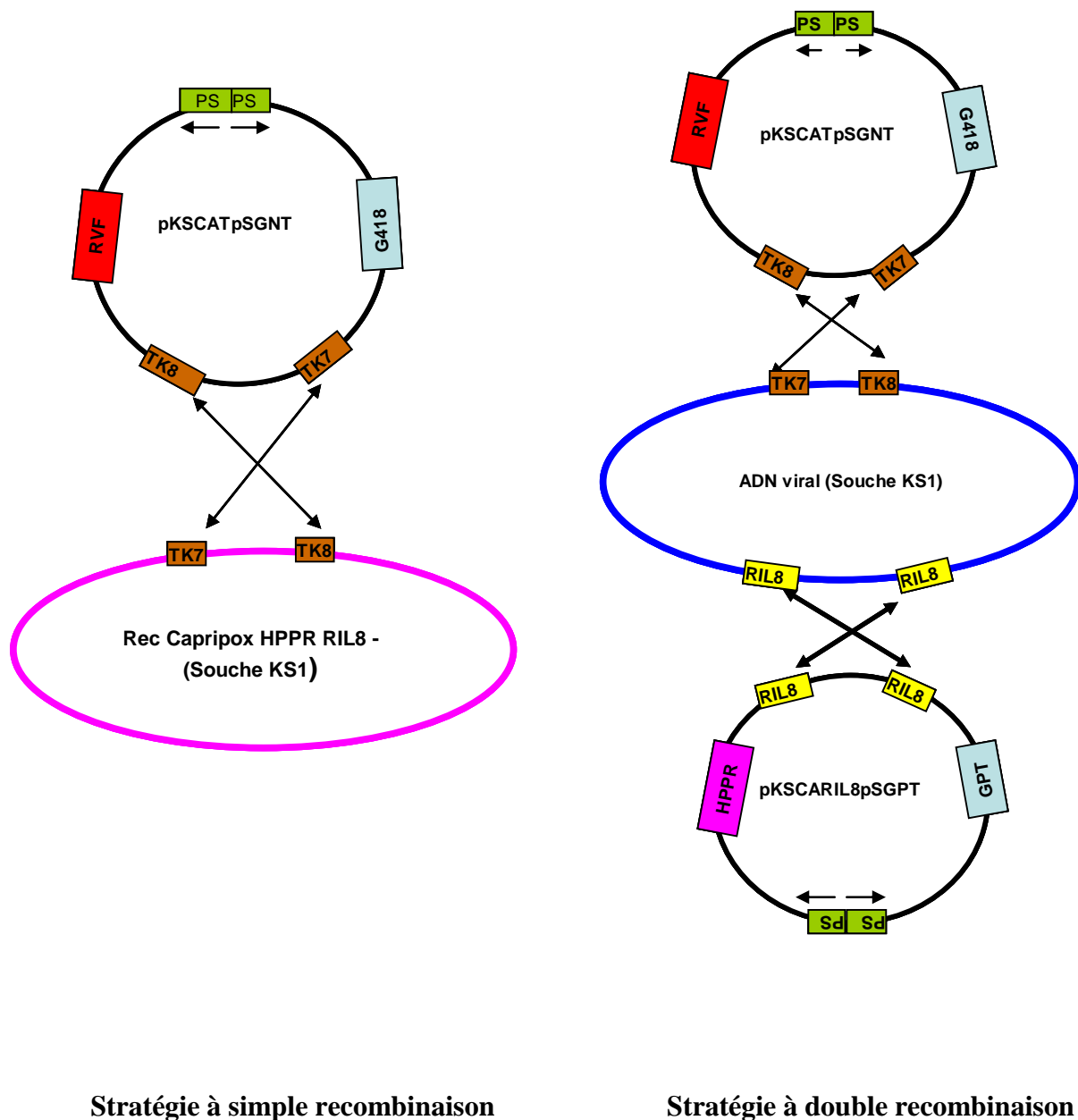
Chaque construction plasmidique est testée afin d'évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt. La cassette d'expression du gène H-PPR ayant déjà été validée antérieurement, cette partie ne concernera donc que les plasmides de transfert pour les gènes spécifiques du virus de la fièvre de la vallée du Rift. La validation *in vitro* de l'expression de chacun de ces gènes s'est faite par immunofluorescence. Pour ce fait, des plaques de culture de 6 puits (NUNC, USA) sont préparées à raison de  $0.8 \times 10^6$  cellules OA3Ts par cupule. Le jour suivant, les cellules à confluence, sont infectées avec le KS-1 à un taux de multiplicité d'infection (MOI) de 1. Le virus infecte les cellules pendant 2 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Pendant ce temps, les solutions de transfection sont préparées en double dans des conditions favorables pour l'agent transfectant (milieu optiMEM, Gibco), la lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA). La lipofectamine 2000 (2 µl) est mis en contact avec 2 µg d'ADN plasmidique. Après 2 h d'incubation, l'inoculum est retiré, les cellules sont lavées 2 fois avec du milieu de culture sans sérum afin d'éliminer l'excédant de virus non intégré aux cellules,

puis le milieu de transfection est ajouté. Les cellules sont incubées 6 heures puis le milieu de transfection est remplacé par du milieu DMEM complet. Un contrôle de transfection, pEGFP (plasmide exprimant le gène de la Green Fluorescent Protein), considéré comme témoin positif, est effectué et suit le même protocole. Après 48h d'infection à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence afin d'évaluer l'efficacité de la transfection par le biais du contrôle positif.

Afin de valider l'expression des gènes, une réaction d'immunofluorescence est réalisée comme suit : Les cellules sont fixées 30 minutes à -20°C à l'acétone froid 80% puis incubées 20 minutes à 37°C avec un tampon de blocage (PBS1X, 2% Lait écrémé). Un liquide d'ascite anti-NSmG2G1 produit chez la souris et fourni par l'Institut Pasteur de Paris (Dr Michèle Bouloy, Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus) est ajouté à une dilution au 1/400<sup>ème</sup> (dans du tampon de blocage), 30 minutes à 37°C. Après trois rinçages en PBS, des anticorps anti-souris marqués à la fluorescein-isothiocyanate (anti-Mouse-FITC, Dako, USA) sont ajoutés au 1/50<sup>ème</sup> (dans du tampon de blocage) et incubés pendant 30 minutes à 37°C. Après trois rinçages en PBS, l'observation est effectuée au microscope à fluorescence (Nikon, éclipse TE300).

### **1.3.2. Transfection, purification et production des capripoxvirus recombinants FVR**

L'obtention du double recombinant capripoxvirus RVF-PPR peut être envisagée selon deux stratégies (figure 41). La première consiste à utiliser comme souche virale recombinante le Recombinant RecCapripox-HPPR-RIL8 déjà disponible, issu de la recombinaison homologe entre le KS1 et le pKSCARIL8pSGPT-HPPR au niveau du site TK (Dubbs, 1964; Wallace & Viljoen, 2005). Quant à la deuxième stratégie, elle comprend une première recombinaison au niveau du site TK entre le plasmide d'expression FVR et la souche KS1. Le recombinant capripoxvirus FVR obtenu sera à son tour utilisé lors de la seconde recombinaison cette fois au niveau du site RIL8 avec la cassette plasmidique contenant le gène H de la PPR, le pKSCARIL8pSGPT-HPPR, ce qui conduit finalement au double recombinant. Le recours à ces deux stratégies se fera conjointement afin d'optimiser l'obtention de ce double recombinant.



**Figure 41** : Représentation schématique des deux stratégies appliquées pour l'élaboration du double recombinant capripoxvirus FVR-PPR. pS: promoteur synthétique, gpt: gène de résistance, g418 : gène de résistance de la g<sup>7</sup>niticine, TK: région flanquante du gène de la thymidine kinase, RIL8 : Région flanquante du gène du récepteur à l'Interleukine 8, H-PPR : gène de l'hémagglutinine du virus de la PPR, RVF : gènes du virus de la FVR : NSmG2G1, NSmG2, G2G1, G1.

Dans les deux éventualités, des cellules OA3Ts sont préparées en plaque 6 puits (NUNC, USA) à raison de  $0.8 \times 10^6$  cellules par cupule en milieu DMEM, 10% SVF. Le lendemain,

les cellules sont transfectées de la même manière que lors de l'expression transitoire et incubées pendant 24h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. En fonction de la stratégie, utilisée pour la conception du double recombinant, le lendemain, le milieu est alors remplacé par du milieu sélectif enrichi en acide mycophénolique (MPA), préparé extemporanément (Falkner *et al.*, 1988). Le milieu sélectif pour ecoGPT est préparé avec du DMEM (Ref CM1DME6B-01, Eurobio, France) avec 4mM Glutamine, 1.5 g/l Sodium bicarbonate, 4500 mg/l Glucose, 1 mM Sodium pyruvate, enrichi en 10%SBF, 1% antibiotiques, MPA 25 µg/ml (Sigma), Xanthine 250 µg/ml, hypoxanthine 15 µg/ml. Le milieu sélectif pour GNT est préparé avec du DMEM (Ref CM1DME6B-01, Eurobio, France) avec 4mM Glutamine, 1.5 g/l Sodium bicarbonate, 4500 mg/l Glucose, 1 mM Sodium pyruvate, enrichi en 10%SBF, 1% antibiotiques, avec 100 µg/ml (Sigma) de généticine (GNT). Ces milieux vont permettre la sélection des virus recombinants en fonction des gènes présents dans les plasmides de transfert utilisé lors des transfections. La pression sélective exercée par l'ajout simultané des deux milieux sélectifs va partiellement éliminer les virus parentaux et favoriser la multiplication des virus double recombinants FVR et PPR. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> jusqu'à apparition d'un effet cytopathique (ECP). Des puits témoins cellules non infectées, en milieu normal et en milieu sélectif, sont présents dans l'expérimentation afin de vérifier l'évolution de l'ECP et l'effet toxique possible du milieu sélectif sur les cellules.

Après apparition d'un ECP, un premier passage en milieu sélectif liquide puis un second en milieu sélectif avec agarose sont effectués afin de purifier les clones obtenus et d'obtenir un clone recombinant le plus pur possible. Des passages successifs ont été nécessaires en milieu liquide afin d'aboutir à un clone recombinant pur quand les PCR de vérification spécifiques du virus sauvage parental donnaient encore des résultats positifs. Les cellules, à confluence, sont pré-incubées 24 h avant l'infection avec du milieu sélectif. Les surnageants récoltés subissent ensuite des dilutions sérielles ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) sous sélection dans des plaques 96 puits. Entre chaque passage, les tapis cellulaires de chaque dilution sont récoltés avec un râteau et subissent trois cycles de congélation (-80°), décongélation (37°C) ainsi qu'un passage aux ultrasons afin de désagréger les particules virales et de libérer les particules virales contenues dans les cellules. Enfin, une centrifugation à faible vitesse (1500 tr/min) pendant 5 minutes permet d'éliminer les débris cellulaires. La présence des virus recombinants ainsi que leur degré de pureté est évalué à la fois par immunofluorescence et par PCR spécifiques (figure 42).

Cas particulier : Utilisation de billes magnétiques, les Carboxyl-Adembeads (Ref 0213, ADEMTECH, France) comme moyen de sélection pour les capripoxvirus double recombinants.

Plusieurs cibles spécifiques telles que les protéines, les oligonucléotides peuvent être facilement couplés de manière covalente directement sur la surface des billes de type Adembeads. Une fois que cette liaison est établie, les billes ainsi marquées peuvent agir au sein d'un lysat ou suspension cellulaire pour capturer la molécule cible correspondante. Après une courte incubation, ces billes sont retirées du mélange par champ magnétique. Ce dispositif va faciliter aussi les étapes de lavage et permettre la concentration des éventuelles particules virales isolées.

Dans le cas de la sélection et purification du double recombinant RecCapripox-FVR-PPR, à partir des dilutions sérielles, la méthode de sélection par billes magnétiques de type Adembeads a été appliquée après avoir vérifié l'expression de la G2 à la surface des cellules OA3Ts infectées. Cette condition est cruciale pour le greffage des billes marquées. Une mise au point des conditions optimales de capture du virus a été réalisée. Elle consiste en 8 combinaisons de marquage de billes avec 2 types d'anticorps anti-FVR (sérum polyclonal FVR zébu mahorais, sérum monoclonal souris anti-NSmG2G1) à tester pour le greffage de la souche FVR modèle vaccinal Smithburn titrée soit à  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml soit à  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml ce qui donne lieu à un total de 16 combinaisons possibles comme indiqué dans le tableau 6.

Selon les recommandations du fournisseur, 2 mg de billes ont été activées et marquées aux anticorps anti-FVR, soit le liquide d'ascite soit un sérum polyclonal provenant d'animal infecté à Mayotte, chacun des deux testés à deux concentrations soit 25µg/µl et 50 µg/µl. Pour chacune de ces concentrations, deux volumes de billes sont testés dans un volume final de suspension virale de 250µl de la souche *smithburn* avec une incubation de 2 heures à 37°C, suivi d'une étape de saturation à la Bovine Sérum Albumine pendant 30 minutes à 37°C. Le surnageant récupéré après fixation des billes au support aimanté sera titré. La ou les meilleures combinaisons qui assurent un greffage maximum des particules virales auront un surnageant de titre très faible voir nul et seront donc retenus pour la sélection du double recombinant capripoxvirus RVF-PPR. Dans ce cas, il y aura deux types de marquage, le premier celui avec l'anticorps anti-FVR qui permettra le greffage des simples recombinants capripoxvirus FVR et des doubles recombinants capripoxvirus FVR-PPR. A partir de cette suspension virale, une incubation avec des billes marquées cette fois avec des anticorps anti-PPR permettra de purifier uniquement les doubles recombinants capripoxvirus FVR-PPR. Il



serait nécessaire que les des isotypes des anticorps anti-FVR et PPR soient différents pour permettre une purification aisée par un double marquage fluorescent qui caractérisera la présence du double recombinant.

Type d'Ac	Concentration d'Ac (µg/µl)	volume d'Adembeads pour le greffage viral (µl)
Liquide d'Ascite (monoclonal)	25	30
		60
	50	30
		60
Sérum polyclonal (animal infecté)	25	30
		60
	50	30
		60

**Tableau 6 :** Combinaisons possibles pour la mise au point de la méthode de greffage de la souche de FVR Smithburn par les billes magnétiques de type Adembeads

Les conditions optimales retenues ont été soit 50 µg d'anticorps coatés dans un volume de 60 µl avec le sérum monoclonal souris soit 50 µg d'anticorps coatés dans un volume de 60 µl avec le sérum polyclonal bovin. Malheureusement, cette tentative de purification du double recombinant par cette technologie ne nous pas permis de l'obtenir pur rapidement, d'autres stratégies sont en cours et seront présentées dans la discussion de ce manuscrit.

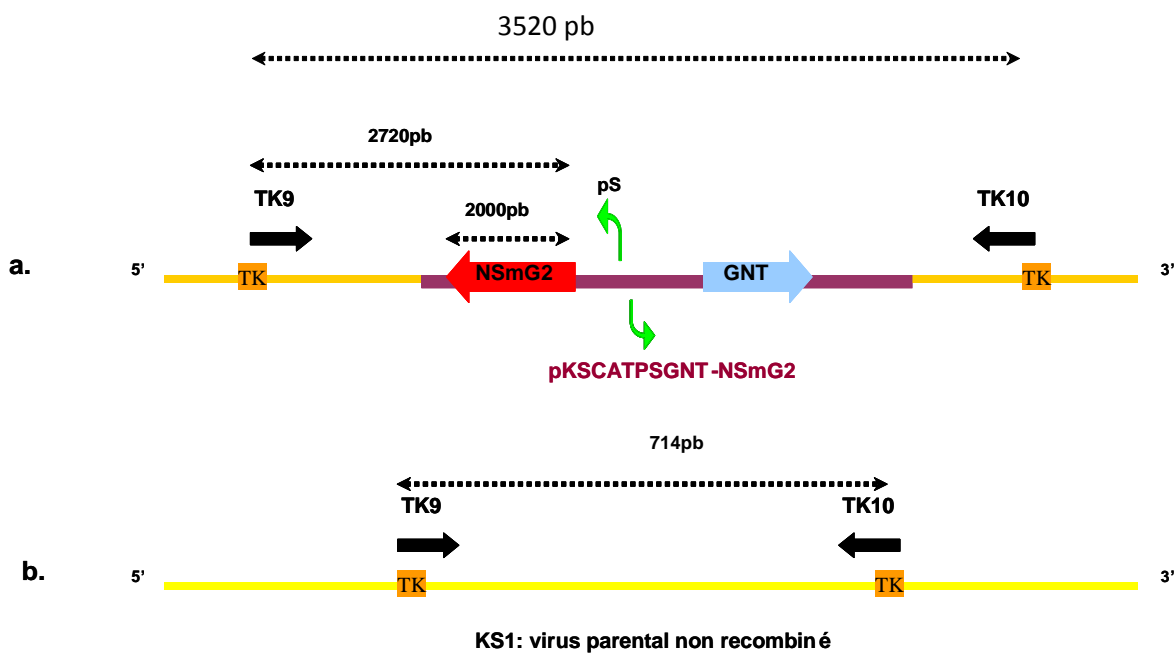
### **1.3.3. Vérification de la présence des gènes insérés, par PCR**

Une méthode d'amplification par PCR a été développée afin de confirmer la présence ainsi que la pureté des recombinants sélectionnés. Plusieurs couples d'amorces ont ainsi été définis à partir des séquences des gènes du virus de la FVR et de celui de la PPR mais aussi, des séquences du gène de la thymidine kinase et celui du récepteur à l'IL8, représentant tous les deux les sites de recombinaison homologue (Annexe 1). Ces différents couples d'amorces nous ont permis :

- de discriminer les virus capripoxvirus recombinants des virus non recombinants/sauvages/parentaux au travers d'une amplification de taille variable en fonction de l'intégration ou non de la cassette d'expression au sein du génome capripoxvirus (CPTK9/CPTK10 pour la TK, et Chemo 9/ Chemo2Bis pour RIL8) (figure 42), mais aussi
- de détecter de façon différentielle un simple recombinant FVR ou PPR du double recombinant FVR-PPR grâce à un couple d'amorces définis à la fois sur le gène de la TK et sur le gène d'intérêt FVR (CPTK9/SpeINFForward) ou sur le gène RIL8 et sur le gène d'intérêt HPPR (chemo2231F/HP56).
- **PCR permettant la différenciation entre le KS1/virus parental sauvage et le simple recombinant FVR suite à une recombinaison homologue obtenue dans le cas de la seconde stratégie envisagée** (figure 41). Pour cela, deux PCR sont appliquées en parallèle, l'une amplifie le gène FVR en entier avec les amorces SpeINF et NotIG2R, et la deuxième est une PCR chevauchante entre l'insert et la séquence de la TK existant uniquement sur le KS1 avec les amorces TK9/ SpeINF. Afin de vérifier l'intégration ou non de la cassette d'expression NSmG2 au sein du génome de KS1, une PCR (TK9, TK10) est effectuée, la taille des amplicons obtenue est de 714 pb et signe la non intégration d'une cassette (figure 42) et correspond donc à du virus sauvage.

**Dans le cas d'un virus sauvage parental,** aucune amplification n'aura lieu avec la PCR spécifique du gène FVR, mais une taille de 714 pb sera obtenue pour une PCR spécifique de la TK (avec les amorces TK9/TK10).

**Dans le cas d'un virus recombinant FVR purifié,** aucune amplification n'aura lieu avec le couple d'amorces TK9/10 spécifique de la TK, mais une amplification de 2000 bp sera obtenue avec les amorces SpeINF et NotIG2R spécifiques du gène FVR. La PCR chevauchante sur le gène de la TK et celui la FVR réalisée avec les amorces NSmG2/TK9 donnera une amplification d'environ 2720 bp comme indiqué dans la figure 42 ci-dessous.

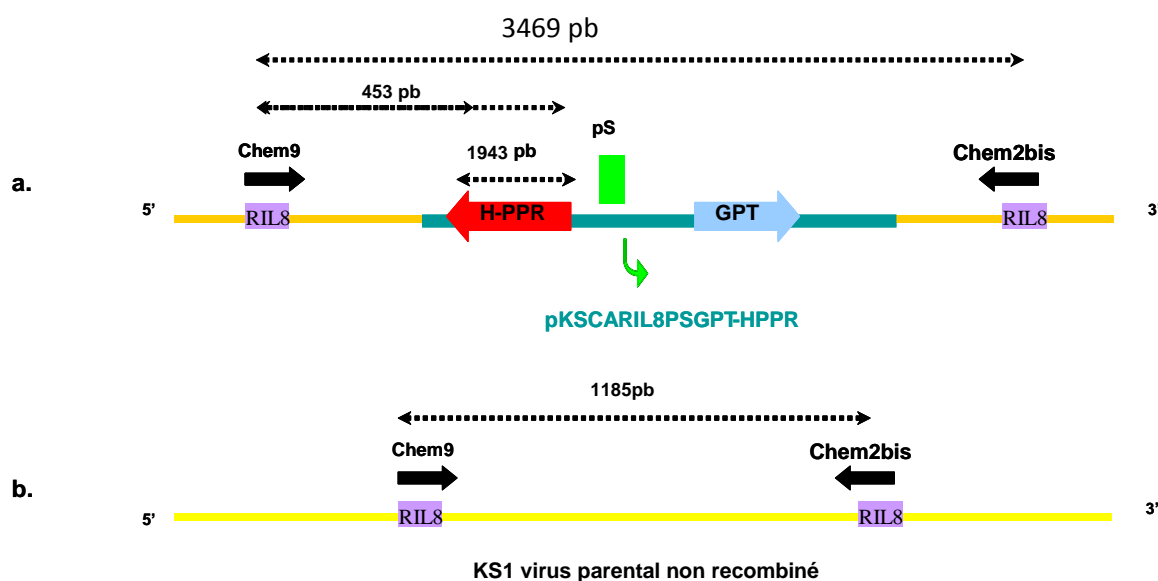


**Figure 42 :** Représentation schématique des tailles d’amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR des capripoxvirus recombinants. a. FVR et b. le virus parental KS1 non recombinant.

Amorces utilisées (gène)	Taille attendue
<i>Capripoxvirus Simple Recombinant FVR</i>	
SpeINF et NotIG2R (Gène NSmG2)	2000 pb
TK9/TK10 (TK)	3520 pb
SpeINF/TK9 (FVR/TK)	2270 pb
<i>Virus Parental K1/Sauvage</i>	
SpeINF et NotIG2R (Gène NSmG2)	Aucune
TK9/TK10 (TK)	714 bp
SpeINF/TK9 (FVR/TK)	Aucune

**Tableau 7 :** Liste des amorces et des tailles attendues pour les PCR de sélection/purification lors du processus de sélection du simple recombinant PPR

- **PCR permettant la différenciation entre le KS1 et le simple recombinant PPR** : le cas est identique à la situation précédente, avec comme seule différence que la recombinaison homologue a lieu au niveau du site RIL8 pour l'élaboration du capripoxvirus PPR (figure 43). Dans ce cas aussi, des couples d'amorces ont été définis pour amplifier d'une part l'insert H-PPR (couples d'amorces HP46/HP47), la séquence chevauchante entre l'insert et une partie du siège de recombinaison appartenant uniquement au virus parental (couples d'amorces HP56/Chemo2231F). Aussi, une PCR spécifique entre recombinant et non recombinant a été aussi définie (chemo2bis/chemo9). Les résultats attendus sont présentés dans le tableau 8.



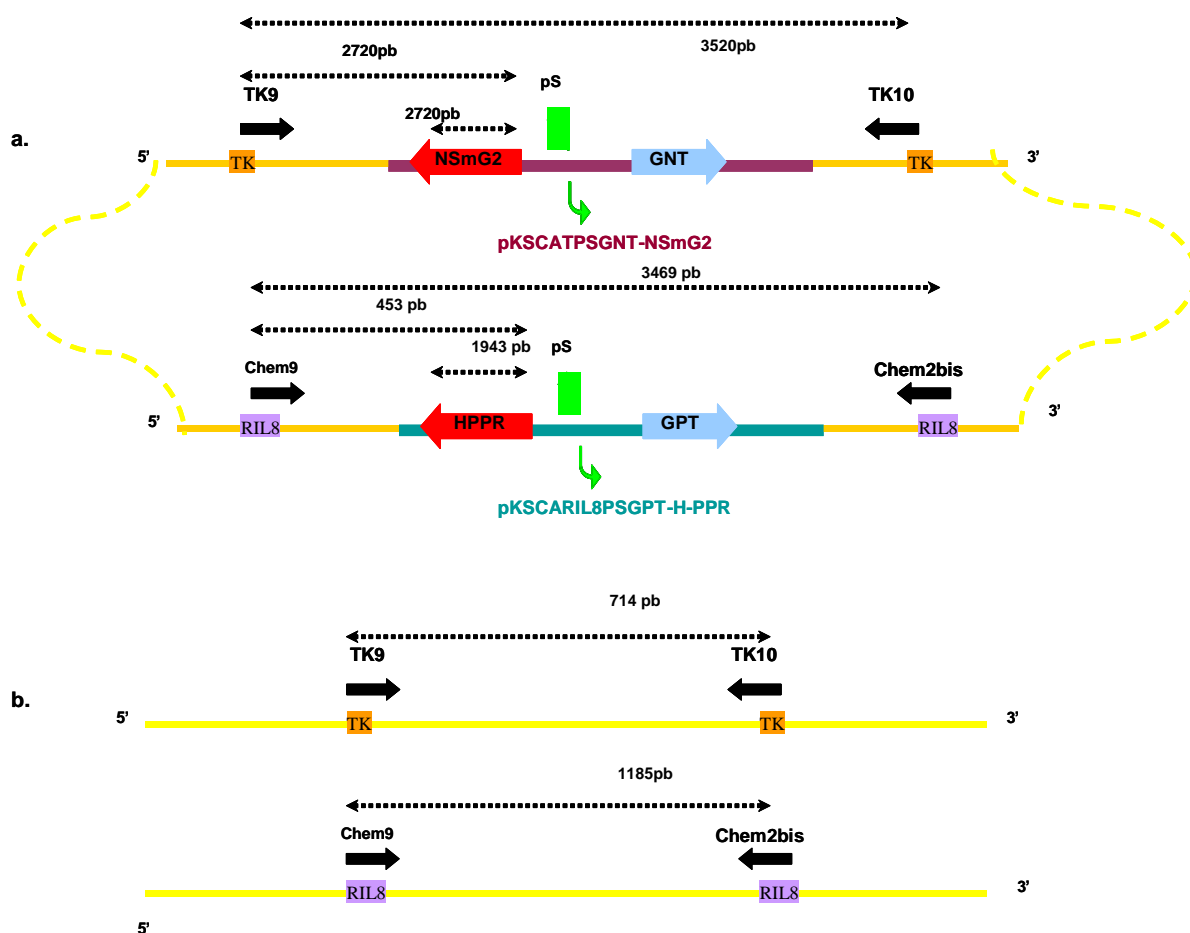
**Figure 43 :** Représentation schématique des tailles d'amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR des capripoxvirus recombinants. a. PPR et b. le virus parental KS1 non recombinant.

Amorces utilisées (gène)	Taille attendue
<i>Capripoxvirus Simple Recombinant H-PPR</i>	
HP46/HP47 (Gène H)	312 pb
Chemo 09/Chemo 2bis (RIL8)	3469 pb
HP56/Chemo 2231F (HPPR/RIL8)	453 pb
<i>Virus Parental KI/Sauvage</i>	
HP46/HP47 (Gène H)	Aucune
Chemo 09/Chemo 2bis (RIL8)	1185 bp
HP56/Chemo 2231F (HPPR/RIL8)	Aucune

**Tableau 8 :** Liste des amorces et des tailles attendues pour les PCR de sélection/purification lors du processus de sélection du simple recombinant PPR

**- PCR permettant la différenciation entre le virus parental KS1 et le double recombinant FVR-PPR**

La différenciation entre le virus parental sauvage KS1 et le capripoxvirus double recombinant FVR-PPR a lieu suite à une combinaison des PCR discriminatives des deux simples recombinants FVR et PPR décrites antérieurement. Schématiquement, la figure 44 présente les deux virus :



**Figure 44 :** Représentation schématique des tailles d’amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR. a. virus recombinant CpoX HPPR en RIL8 et FVR en TK. b. le virus parental KS1.

Afin de vérifier l’intégration ou non de la cassette d’expression NSmG2 au sein du génome de KS1 et du gène H-PPR au sein du site RIL8, une série de PCR sur les sites d’insertion TK (TK9, TK10) et RIL8 est effectuée (Chemo 02Bis/Chemo09) est effectuée, les tailles attendues sont présentées dans le tableau 9.

**Dans le cas d’un virus sauvage parental,** aucune amplification n’aura lieu avec la PCR spécifique des gènes FVR et PPR, mais une taille de 714 pb sera obtenue pour une PCR spécifique de la TK (avec les amorces TK9/TK10) et 1185 pb pour le site RIL8 (Chemo 02Bis/Chemo09).

**Dans le cas d’un virus recombinant FVR-PPR purifié,** une amplification de grande taille (3520 pb) aura lieu avec le couple d’amorces TK9/10 spécifique de la TK ayant intégré le gène FVR, avec une amplification de 2000 bp obtenue pour le gène FVR avec les amorces

SpeINF et NotIG2R spécifiques. Les PCR chevauchantes sur le gène de la TK/FVR r et RIL8/HPPR présenteront les amplicons des tailles 2270 pb et 453 pb respectivement.

Noms des séquences (gène)	Taille attendue
<b><i>Capripoxvirus FVR-PPR</i></b>	
SpeINF et NotIG2R (Gène NSmG2)	2000 pb
TK9/TK10 (TK)	3520 pb
SpeINF/TK9 (FVR/TK)	2270 pb
HP46/HP47 (Gène H)	312 pb
Chemo 09/Chemo 2bis (RIL8)	3469 pb
HP56/Chemo 2231F (HPPR/RIL8)	453 pb
<b><i>Virus parental KS1</i></b>	
TK9/TK10 (TK)	714 pb
HP46/HP47 (Gène H)	Aucune
Chemo 09/Chemo 2bis (RIL8)	1185 pb
HP56/Chemo 2231F (HPPR/RIL8)	Aucune

**Tableau 9 :** Liste des amorces et des tailles attendues pour les PCR de sélection/purification lors du processus de sélection du double recombinant FVR-PPR

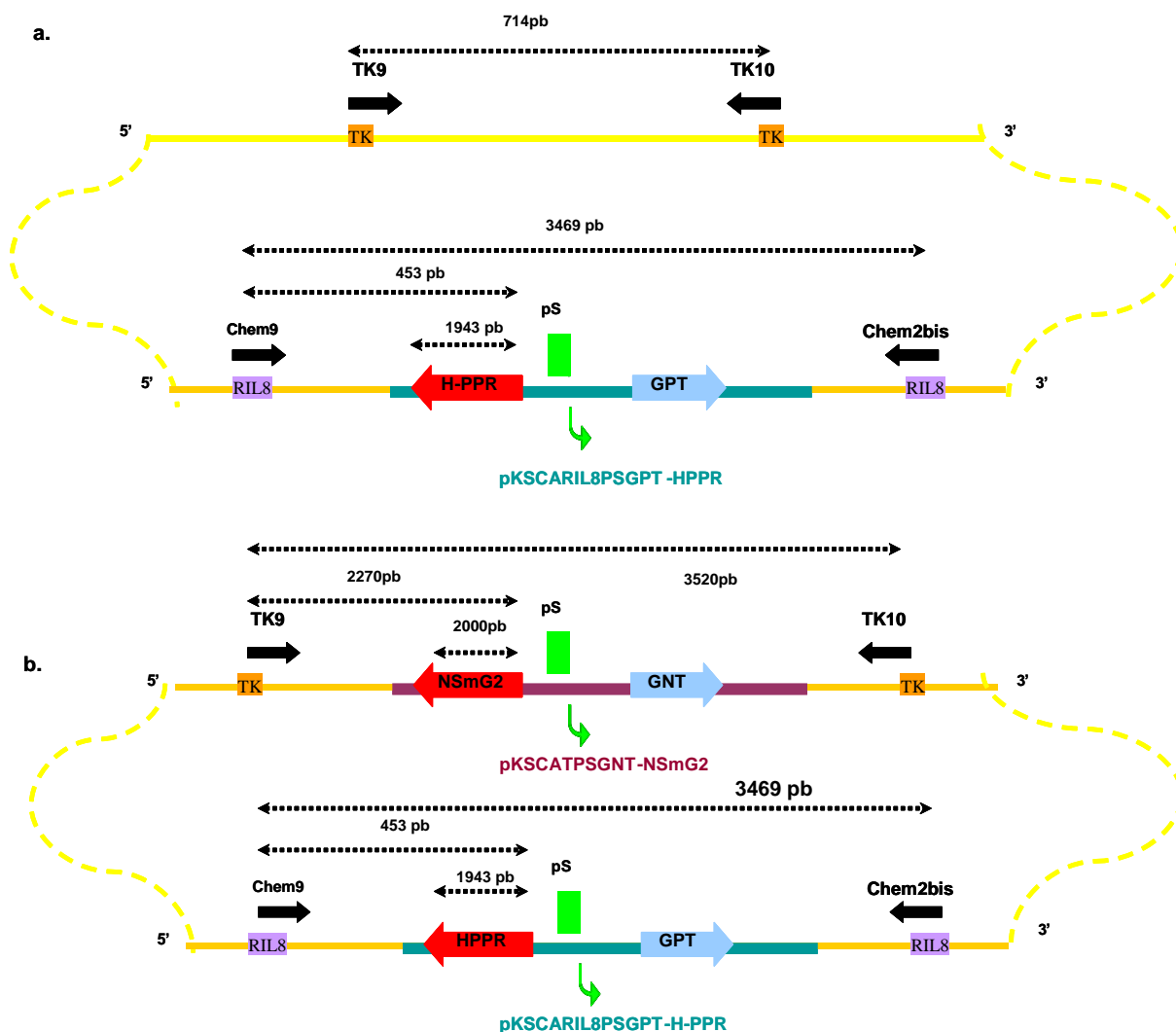
- **PCR permettant la différentiation entre le simple recombinant PPR et le double recombinant FVR-PPR :** cette situation concerne la 1<sup>ère</sup> stratégie présentée en Figure 41 pour l'élaboration du double recombinant. Dans ce cas également, les PCR précédemment définies sont utilisées mais selon une combinaison adaptée au contexte comme présenté dans le tableau 10 et la figure 45 et permettent d'affirmer et de conclure sur la présence du double recombinant FVR-PPR versus un simple recombinant PPR.

Noms des séquences (gène)	Taille attendue
<b><i>Double Capripoxvirus FVR-PPR</i></b>	
SpeINF et NotIG2R (Gène NSmG2)	2000 pb
TK9/TK10 (TK)	3520 pb
SpeINF/TK9 (FVR/TK)	2270 pb
HP46/HP47 (Gène H)	312 pb
Chemo 09/Chemo 2bis (RIL8)	3469 pb
HP56/Chemo 2231F (HPPR/RIL8)	453 pb
<b><i>Simple Capripoxvirus PPR</i></b>	
SpeINF et NotIG2R (Gène NSmG2)	Aucune
TK9/TK10 (TK)	714 pb
SpeINF/TK9 (FVR/TK)	Aucune
HP46/HP47 (Gène H)	312 pb
Chemo 09/Chemo 2bis (RIL8)	3469 pb
HP56/Chemo 2231F (HPPR/RIL8)	453 pb

**Tableau 10:** Liste des amorces et des tailles attendues pour les PCR de sélection/purification lors du processus de sélection permettant de distinguer le simple recombinant HPPR du double recombinant FVR-PPR

Les virus parentaux et recombinants sont donc amplifiés après observation d'un ECP, avec les couples d'amorces qui leur sont spécifiques et qui permettent par la suite de justifier de leur présence ou non dans la suspension virale. Les réactions de PCR se font dans un volume final de 25 µl réparti de la manière suivante: Tampon 10x (Qiagen, USA), 125 µM de chaque dNTP (Eurobio, France), 100 ng de chaque amorce et 2,5 U de Taq polymérase (Qiagen, USA), 5 µl d'ADN viral. Les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% avec bromure d'éthidium.





**Figure 45 :** Représentation schématique des tailles d’amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR. a. virus simple recombinant CpoX HPPR en RIL8. b. virus recombinant CpoX HPPR en RIL8 et FVR en TK

#### 1.3.4. Vérification de l’expression protéique des gènes d’intérêt par immunofluorescence

La production de protéines par les virus recombinants lors des dilutions sérielles peut également être évaluée par immunofluorescence. La technique utilisée est la même que celle employée lors de l’expression *in vitro* des virus recombinants (cf paragraphe 1-3-1).

#### 1.4. Production et titrage des capripoxvirus recombinants

Une production de chaque recombinant est effectuée en flacons de culture de type T150 (Falcon, USA) après purification complète de ces derniers, vérifiée par PCR avec des amorces spécifiques. Une fois le volume désiré obtenu, un titrage en milieu sélectif est effectué selon la technique Spearman (Johnson *et al.*, 1961).

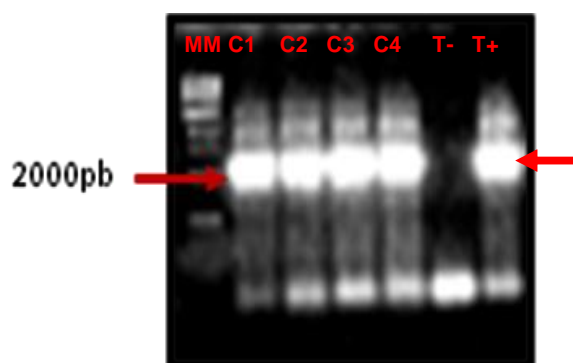
## **2 . Résultats**

Les résultats concernant cette partie seront valorisés dans une publication soumise à Veterinary Immunology and Immunopathology.

### **2.1. Vérification des constructions plasmidiques**

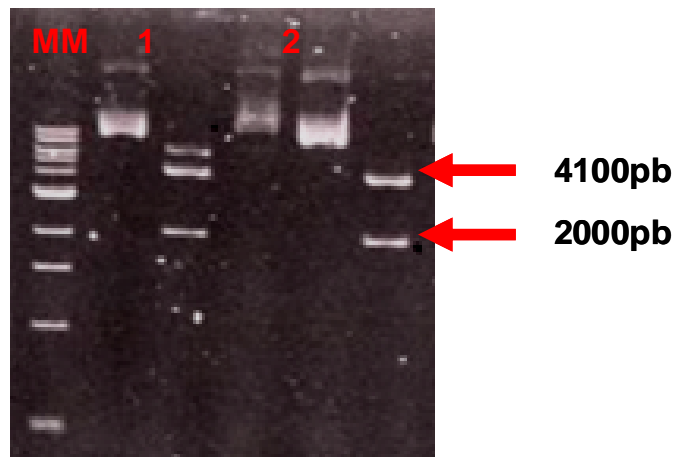
Concernant les cassettes d'expression FVR, seulement les inserts NSmG2G1 et NSmG2 ont pu être clonés. Dans ce paragraphe, l'exemple de NSmG2 sera détaillé. Les différentes étapes ayant permis sa construction finale sont les suivantes :

- a. Après amplification de NSmG2 par PCR à partir du plasmide pTVT7-M, l'insertion dans le plasmide de transfert pKSCATPSGPT a abouti sous forme d'un clonage dirigé en SpeI/NotI. La figure 46 met en évidence la présence de cet insert dans différents clones après transformation bactérienne avec la souche *E.coli*, XL10-Gold. Les quatre clones présentés dans cette figure sont tous positifs avec l'obtention d'une bande à la taille attendue de 2000 pb. Les contrôles négatifs et positifs correspondent aux résultats attendus.



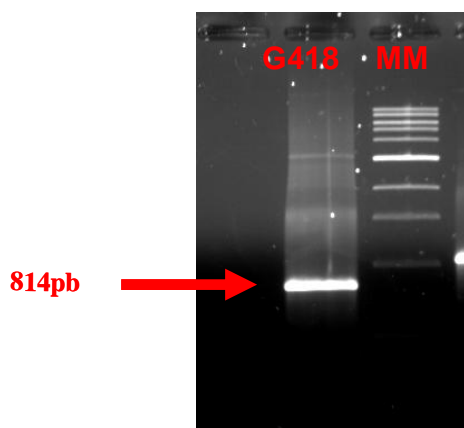
**Figure 46 :** Gel Agarose 1% BET présentant le criblage de colonies bactériennes, par PCR, au cours de la transformation du pKSCATpSGPT-NSmG2.MM : Marqueur de poids moléculaire, C1, C2, C3, C4 : colonies bactériennes, T- : contrôle négatif, T+ : contrôle positif

- b. Validation du clone choisi par digestion enzymatique. La figure suivante présente un gel d'agarose 1% + BET avec des résultats d'une double digestion enzymatique SpeI/NotI permettant de confirmer l'insertion du gène NSmG2 dans le plasmide de transfert. Deux bandes spécifiques à 4100 pb et 2000 pb ont été obtenues et correspondent respectivement au plasmide de transfert et au segment d'intérêt NSmG2.



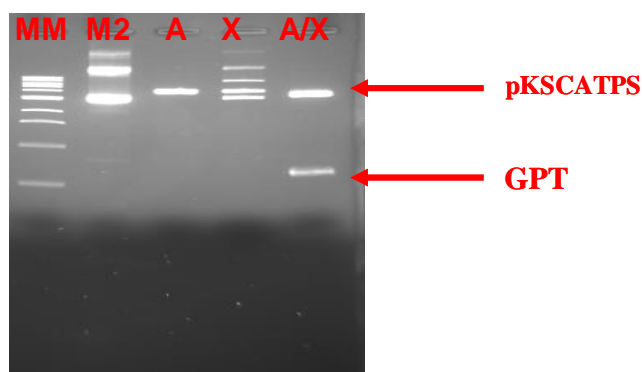
**Figure 47** : Double digestion enzymatique par SpeI NotI du plasmide pKSCATpSGPT-NSmG2 MM : Marqueur de poids moléculaire, 1 et 2 : pKSCATpSGPT-NSmG2 digéré en SpeI/ NotI

- c. Insertion du gène G418 à la place du gène EcoGPT avec création par mutagenèse dirigée du site XhoI. L'amplification du gène G418 de la gèniticine avec les amorces G418F et G418R (Annexe 1) à partir du plasmide donneur pTOPOXL-G418 a donné une bande à la taille attendue de 814pb. Le résultat présenté en Figure 48 est révélé par électrophorèse sur gel d'agarose de 1% présenté dans la figure suivante :



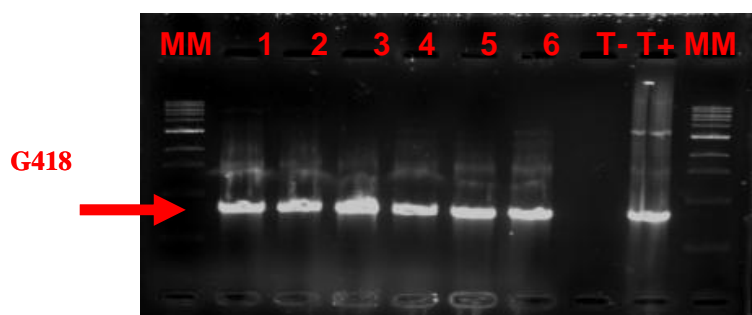
**Figure 48 :** Amplification de la généticine à partir du pTOPOXL. MM : marqueur moléculaire, G418 : gène de la généticine

L'insertion du nouveau marqueur G418 dans le plasmide de transfert et à la place du gène *ecoGPT* a nécessité la création du site *XhoI* par mutagenèse dirigée. Les résultats sont illustrés dans la figure 49 suivante. La double digestion *ApaI/XhoI* met en évidence deux bandes de 3700bp et 400pb correspondant au plasmide et à la GPT.



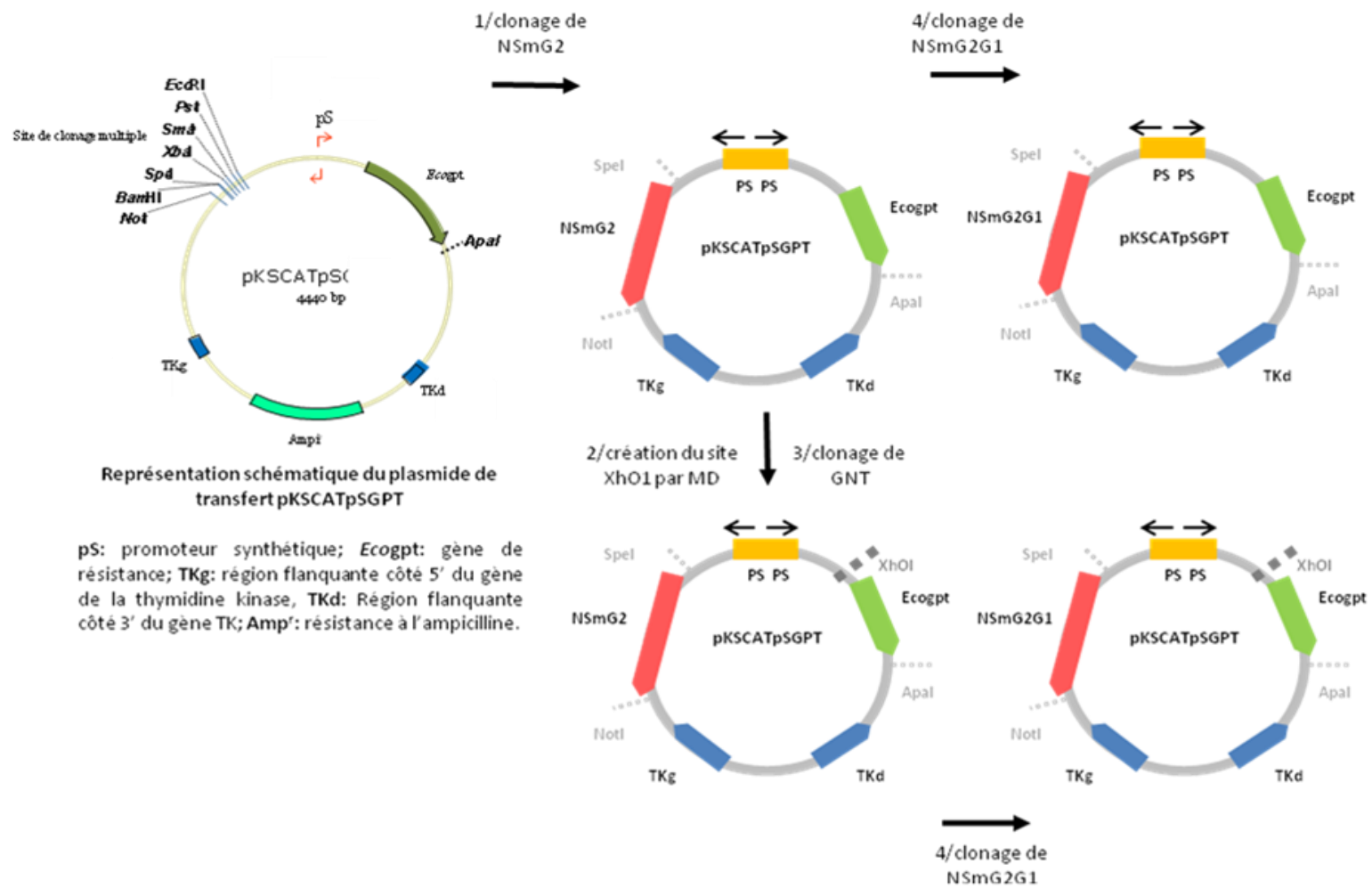
**Figure 49 :** Gel agarose 1%+BET illustrant la création du site *XhoI* par mutagenèse dirigée dans le plasmide de transfert pKSCATPSGPT. M2 : pKSCATPSGPT, A : digestion en *ApaI* du plasmide, X : digestion en *XhoI* du plasmide, A/*XhoI* : double digestion en *ApaI* et *XhoI* du plasmide, MM : poids moléculaire de 1kb (Invitrogen, USA).

L'amplification du plasmide de transfert pKSCATPSGPT ayant inséré le nouveau marqueur G418 à la place du gène *EcoGPT*, en bactéries *E.coli* a donné lieu à plusieurs clones positifs. La figure 50 met en évidence ces résultats où la bande attendue de 814pb de la G418 est visualisée dans la totalité des échantillons criblés.



**Figure 50:** Gel agarose 1%+BET présentant les clones bactériens ayant intégré le gène de la G418 en pKSCATPSGPT dans les 6 clones testés. MM : poids moléculaire 1kb ; 1,2,3,4,5,6 : colonies testées ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif.

Finalement pour conclure sur cette première partie de chapitre, quatre plasmides de transfert différents ont été obtenus comme présenté en figure 51. Ils expriment individuellement les gènes NSmG2G1 et NSmG2. Avec des marqueurs de sélection différents soit la GPT soit la GNT ou G418. Plusieurs constructions n'ont pas abouti, en raison de la composition en %GC des séquences, de la toxicité connue de G1.



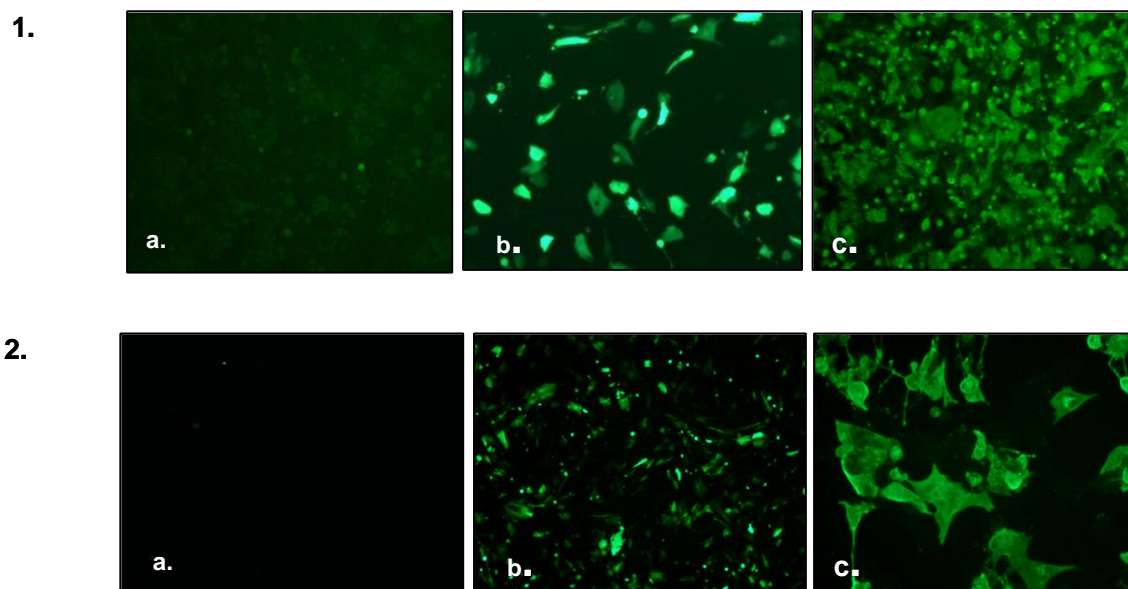
**Figure 51** : Présentation des 4 plasmides de transfert construits pour l'élaboration du double recombinant capripoxvirus FVR PPR

## **2.2. Validation de l'expression des capripoxvirus recombinants FVR**

### **2.2.1. Expression in vitro des constructions plasmidiques**

L'objectif de ce premier paragraphe est la validation par expression transitoire de la fonctionnalité *in vitro* de chacune des constructions plasmidiques. L'expression des gènes d'intérêt peut se mesurer de plusieurs façons et notamment par la technique d'immunofluorescence quand des anticorps spécifiques dirigés contre les gènes d'intérêt sont disponibles. On rappelle que la cassette d'expression H-PPR a été déjà validée dans des travaux antérieurs et ne sera pas mentionnée dans cette partie, seules les constructions concernant les gènes RVF le seront.

La figure 52 présente le témoin négatif (a) et le témoin positif (b) correspondant respectivement aux cellules OA3Ts non infectées et aux cellules transfectées avec un plasmide exprimant la «green fluorescent protein», le pEGPC1 (Clontech, USA). Ces contrôles ont suivi le même protocole de fixation et de marquage que les échantillons. Le niveau d'expression des deux plasmides de transfert exprimant respectivement le gène NSmG2G1 et le gène NSmG2 du virus de la fièvre de la vallée de la vallée du rift figurent en (c) respectivement en (1) et (2).

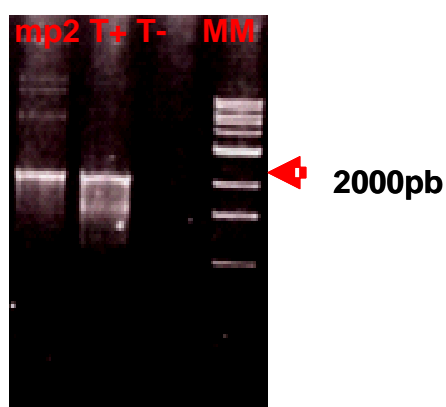


**Figure 52 :** Détection par immunofluorescence de l'expression de la glycoprotéine G2 dans des cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGNT-NSmG2G1 et le plasmide pKSCATpSGNT-NSmG2. 1. a. témoin négatif cellules, b. témoin positif pEGFP, c. pKSCATpSGNT-NSmG2G1 après 48h d'infection. 2. a. témoin négatif cellules, b. témoin

positif pEGFP, c. pKSCATpSGNT-NSmG2 après 48h d'infection (microscope optique à fluorescence x10).

La faible fluorescence obtenue en Figure 52 Cliché 1.c. concernant la validation de l'expression de la construction NSmG2G1 n'est pas satisfaisante en comparaison à celle obtenue sur le cliché 2.c correspondant à l'expression de la construction NSmG2, qui est elle donc validée. La construction NSmG2G1 reste douteuse, une modification de séquence importante intégrant un codon stop a été relevée au niveau du site d'insertion TK. Il en résulte donc une seule construction valide pKSCATpSGNT-NSmG2, exprimant la G2 pour l'élaboration du capripoxvirus double recombinant. FVR-PPR.

Le gel d'agarose (1% TBE + BET) de la figure 53 présente les produits d'amplification obtenus après une PCR spécifique du gène NSmG2 à partir du plasmide de transfert construit. La taille amplifiée de 2000 pb correspond à celle de l'insert. La vérification de la séquence de ce dernier a été aussi réalisée et est identique à celle de la séquence gène ZH548 contenue dans le plasmide pTVT7 qui nous a été fournie par le Dr Michèle Bouloy,

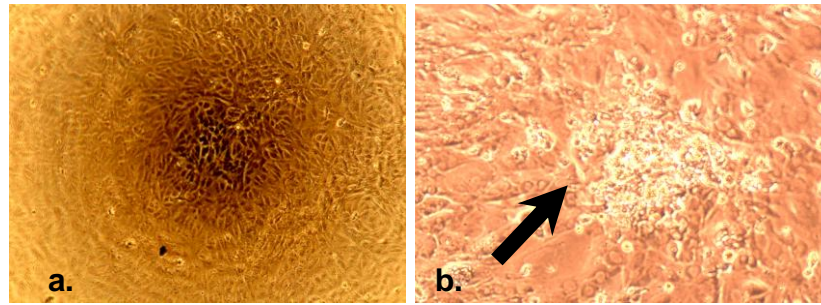


**Figure 53** : Mise en évidence du gène NSmG2 dans le plasmide de transfert pKSCATPSGNT sur gel agarose 1%+BET. mp2 : ADN plasmidique pKSCATPSGNT préparé par Minipréparation (kit Promega); T+ : témoin positif, T- / témoin négatif, MM : poids moléculaire 1kb (Invitrogen, USA)

### 2.2.2. Obtention des capripoxvirus recombinants

Quelque soit la stratégie appliquée pour l'élaboration du double recombinant, l'observation d'un effet cytopathique ECP sur un tapis cellulaire permissif de lignée OA3.Ts dans notre cas permet de mettre en évidence la présence d'un foyer infectieux avec présence de particules virales. La figure 54 ci-dessous illustre le phénotype cellulaire d'une plaque de lyse observé.





**Figure 54** - Effet cytopathique observé sur des cellules OA3Ts infectées par le recombinant CpoX-NSmG2, en milieu sélectif liquide. a. Contrôle négatif correspondant à des cellules OA3Ts non infectées, b. Cellules OA3Ts transfectées avec le recombinant CpoX-NSmG2 (Grossissement x 4).

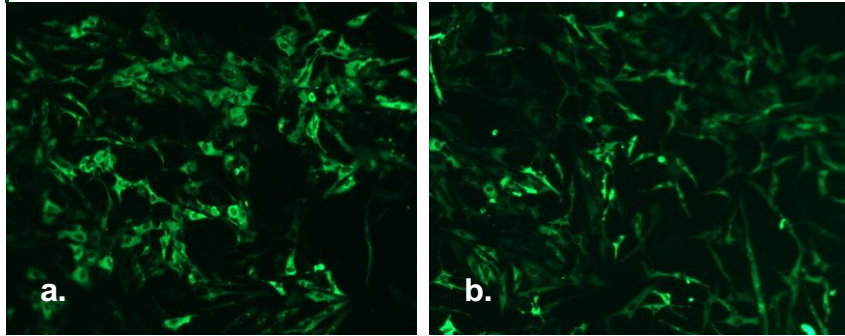
L'effet cytopathique observé se présente sous forme d'une plaque de lyse qui dans les meilleures conditions doit correspondre à un clone unique et pur du virus recombinant. Cet aspect a été observé aussi bien pour les simples recombinants CpoX-FVR et CpoX-HPPR que pour le double recombinant CpoX FVR-HPPR.

**Finalement, les différentes recombinaisons homologues réalisées ont abouti à l'obtention de 13 capripoxvirus simple recombinants RecCpoX FVR et 6 capripoxvirus double recombinants CpoX FVR-PPR.**

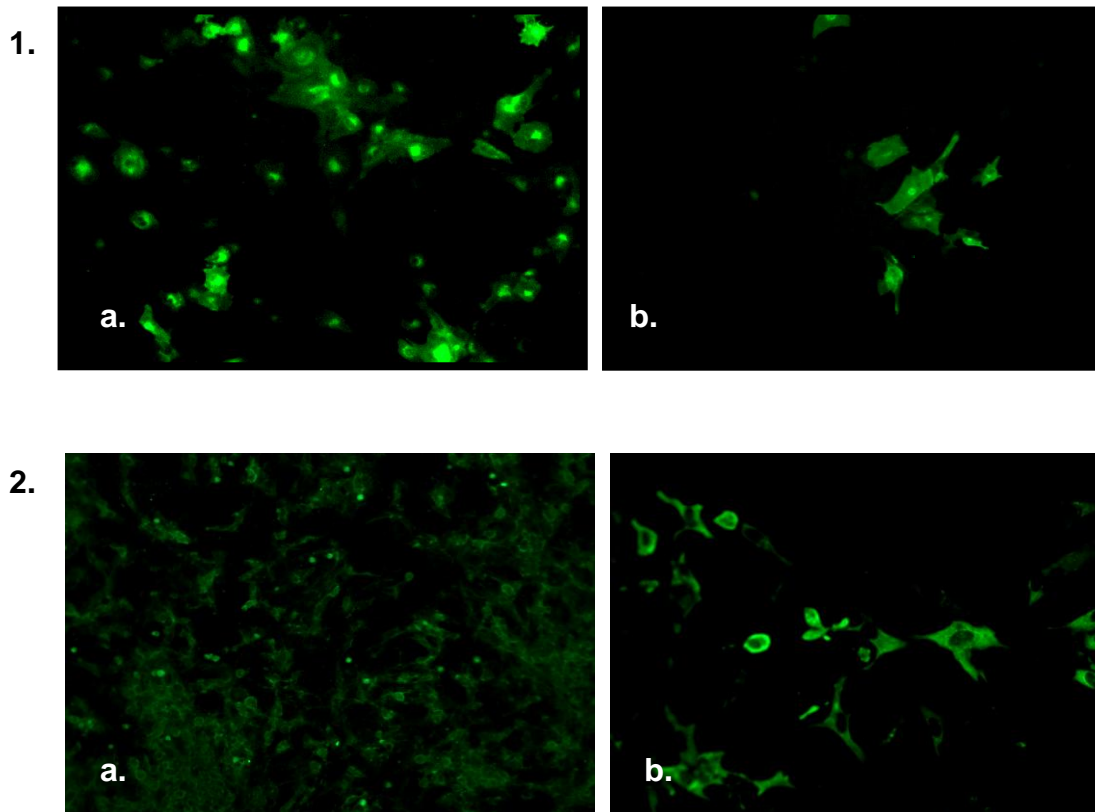
La mise en évidence de ces recombinants et l'évaluation de leur taux de pureté sont réalisées par deux techniques complémentaires rapides et simples à appliquer, l'immunofluorescence et l'amplification par PCR spécifique.

#### 2-2-2-1 - Analyse par immunofluorescence

L'expression de la glycoprotéine G2 du virus de la fièvre de la vallée de rift et l'expression de l'hémagglutinine H du virus de la peste des petits ruminants sont présentées en figure 55 et 56 respectivement.. Dans chaque cas, l'évaluation de la fluorescence est comparée à un témoin viral positif. L'expression des transgènes a été mise en évidence pour la totalité des virus simple ou double recombinants.



**Figure 55** : Détection des anticorps anti- G2 par IF dans des cellules OA3.Ts infectées par une suspension virale du simple recombinant CpoX-FVR. a. Expression de la G2 dans la souche smithburn (Témoin Positif). b. Expression de la G2 dans le Rec CpoX-NSmG2



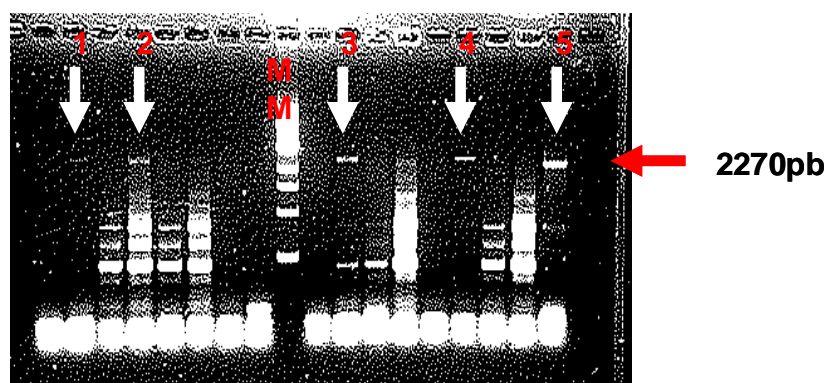
**Figure 56** : Révélation de l'expression de la glycoprotéine G2 et de l'hémagglutinine H par IF dans le cas d'un double recombinant RecCpoX-NSmG2-HPPR. 1a. Expression de la HPPR dans le Rec CpoX-NSmG2-HPPR. 1b. Expression de la G2 dans le Rec CpoX-NSmG2-HPPR. 2a : expression de la HPPR de la souche vaccinale de PPR,Nigeria 75/1 (Témoin Positif) 2b : expression de la G2 dans la souche FVR vaccinal Smithburn (Témoin Positif)

### 2-2-2-2 – Vérification des clones par PCR

Une bande à la taille attendue de 2270 pb a été obtenue après amplification spécifique du fragment NSmG2 par PCR pour la totalité des virus recombinants clonés et purifiés, essentiellement pour les simples recombinants FVR, Rec CpoXNSmG2FVR à partir de cultures cellulaires lysées sans extraction. Concernant le double recombinant, la mise en évidence des inserts a eu lieu à partir d'ADN viral extrait des cultures cellulaires infectées par le kit QIAmp DNA Mini (Qiagen, USA). Les figures 57 et 58 présentent les gels d'agarose 1% TBE + BET avec les résultats d'amplification par PCR obtenus pour le recombinant CpoXNSmG2 et le recombinant CpoXNSmG2-HPPR respectivement lors de passage en milieu sélectif.



**Figure 57 :** Amplification par PCR spécifique du fragment NSmG2 dans les 8 clones simple recombinants Rec CpoXNSmG2. Les puits 1,2,3,4,5,6,7,8 correspondent à 8 des clones simple recombinants CpoXNSmG2-FVR. MM : Poids moléculaire 1kb (Invitrogen, USA) ; T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif.

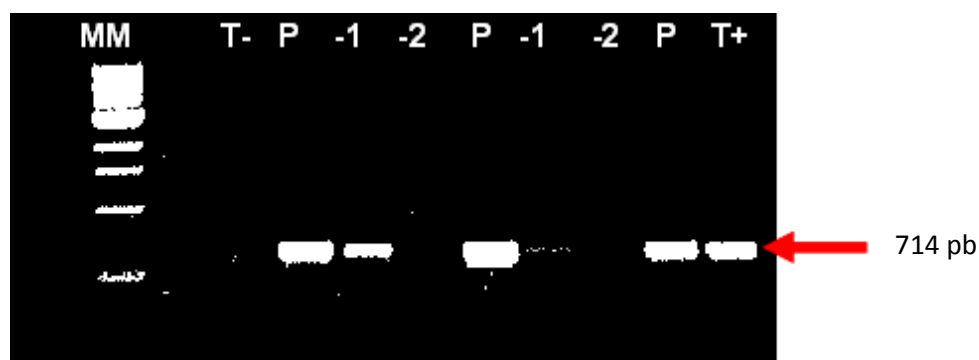


**Figure 58** : Amplification par PCR spécifique du fragment NSmG2 dans 5 des 6 double Rec CpoXNSmG2-HPPR. Les puits 1,2,3,4,5 correspondent à 5 clones de Rec poXNSmG2-HPPR. MM : poids moléculaire 1kb (Invitrogen, USA).

## 2.3 . Purification des capripoxvirus recombinants

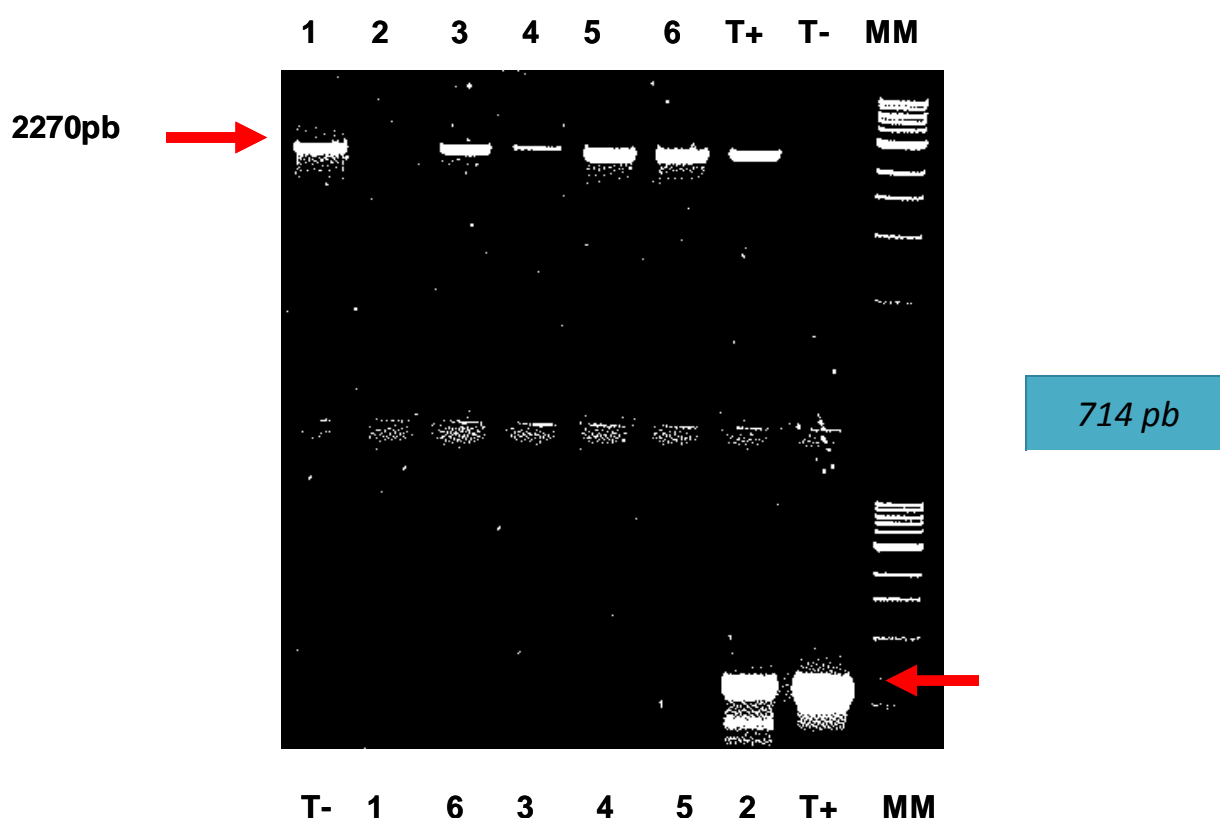
### **2.3.1. Exemple du simple recombinant capripoxvirus FVR élaboré à partir du pKSCATPSgpt-NSmG2 et du KS1**

Le recombinant a été obtenu sous la sélection du gène *EcoGPT* contrairement à ce qui était prévu au début, en effet, le gène marqueur de la généticine avait été choisi au départ comme marqueur de sélection. Les tentatives de sélection et de purification avec ce nouveau marqueur n'ont pas été concluantes. Le milieu de sélection GPT a été modifié en termes de concentrations de ses agents de sélection, acide mycophénolique, xanthine et hypoxanthine. Les conditions optimales (MPA 25 µg/ml, Xanthine 250 µg/ml, Hypxanthine 15 µg/ml, SBF 2,5%) ont permis la sélection et la purification des recombinants par des dilutions sérielles en liquide en plaque 96 puits. A chaque dilution limite, les plages de lyse récoltées sont testées par deux types de PCR, la première correspond à une amplification spécifique du virus parental (TK ou RIL8 du KS1) et la seconde est spécifique du gène d'intérêt (H de PPR ou NSmG2 de FVR). La figure 59 présente les résultats de la première amplification obtenu au cours de la purification par dilution limite du simple recombinant CpoXNSmG2-FVR où un amplicon spécifique de 714 pb est présent et correspond au virus parental. La différence d'intensité des bandes obtenues spécifique du virus KS1 parental entre le puits « pur » et le puits contenant la dilution -2 du recombinant est nette, ce qui illustre ici l'intérêt de l'utilisation de cette méthode de dilution limite dans la purification des recombinants.



**Figure 59** : Amplification par PCR avec les amorces TK9/TK10, spécifique du virus parental KS1 obtenue au cours du processus de purification du recombinant CpoXNSmG2. MM : marqueur de poids moléculaire 1kb ; P : pur ; -1,-2 : dilution ; T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif

La figure 60 présente les résultats des 2 amplifications spécifiques du gène d'intérêt (partie haute de la figure) et du virus sauvage (partie basse de la figure) obtenues pour de la dernière dilution limite. Les recombinants CpoXNSmG2 des puits 1, 3, 4, 5 et 6 sont considérés comme purs puisqu'aucune bande de 714 pb n'est présente pour ces 5 clones. En revanche, un amplicon de 2270 pb est obtenu pour ces 5 clones, signant la présence du fragment NSmG2-FVR. Ceci n'est pas le cas du Recombinant présent dans le puits 2 qui ne présente pas la bande de 2270 pb attendue, il sera donc éliminé pour la suite.

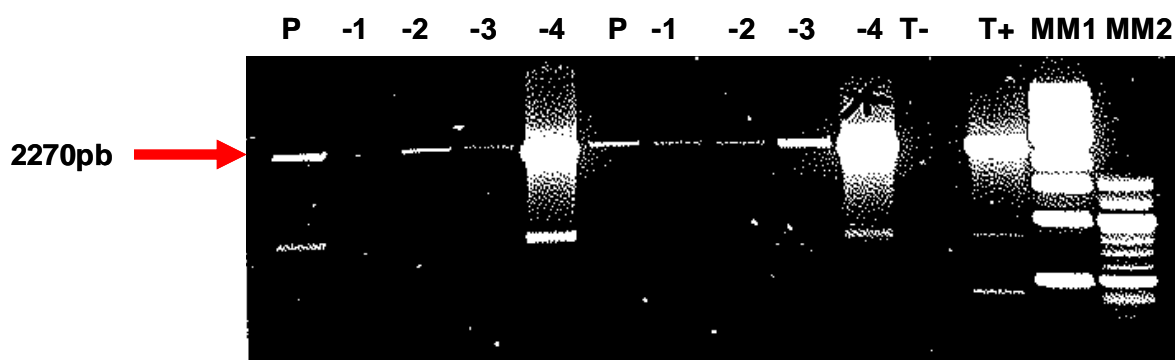


**Figure 60** : Amplification par PCR de 5 recombinants CpoXNSmG2 purs. MM : marqueur de poids moléculaire 1kb ; 1,3,4,5,6 : CpoXNSmG2 pur ; 2 : CpoXNSmG2 non purifié T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif

Suite à ces résultats présentant donc des clones purifiés, l'étape de la production du recombinant peut être envisagée tout en gardant une pression de sélection GPT.

### 2.3.2. Exemple du bouble recombinant le capripoxvirus FVR-PPR obtenu à partir du pKSCATPSGPT-NSmG2FVR-HPPR

Dans un premier temps, la méthode de pression sélective a été utilisée comme moyen de purification du double recombinant comme illustré en figure 61 avec les premières dilutions sérielles. Le degré de pureté est apprécié par les résultats obtenus par la combinaison des 4 types de PCR décrites dans le tableau 9. La PCR réalisée avec les amorces SpeINF/TK9 est déterminante, puisqu'elle amplifie le fragment NSmG2 du gène M de FVR, tout en chevauchant sur la partie flanquante du gène de la TK du virus parental. La figure 61 présente les résultats de cette amplification avec l'obtention d'un amplicon à 2270pb avec une intensité de cette bande inversement croissante à la dilution sérielle testée. Plus le virus est dilué (dilution -4 par exemple), plus la bande spécifique est intense, ceci nous permet donc de confirmer la pureté du clone en dilution -4, qui sera vérifiée également par l'absence de bandes lors d'une PCR spécifique du TK du virus parental (amorces TK9/TK10).



**Figure 61 :** Amplification par PCR spécifique de NSmG2 lors du processus de purification des virus double recombinants sélectionnés. MM1 : marqueur de poids moléculaire 1kb (Invitrogen, USA); MM2 : marqueur de sélection 100pb (Invitrogen, USA) ; P, -1,-2, -3, -4 : dilution ; T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif

Malgré ces résultats encourageants, cette méthode ne nous a pas permis d'aboutir à une purification satisfaisante du capripoxvirus double recombinant FVR-PPR puisque ce dernier ne possède qu'un seul et unique marqueur de sélection qu'est la GPT, ce qui entrainera

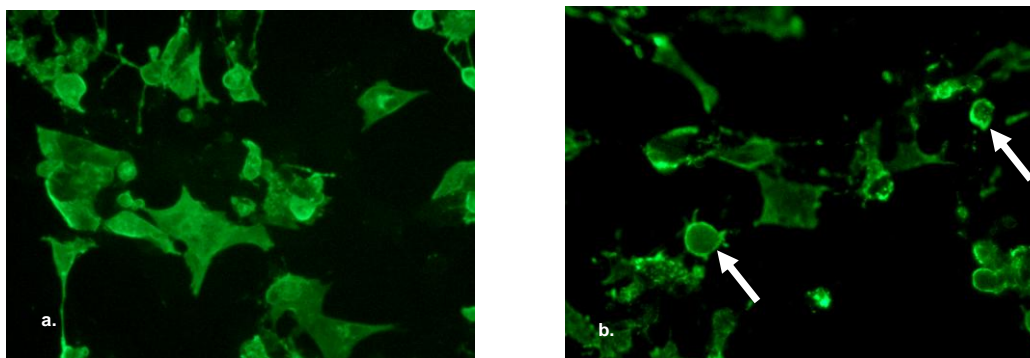
toujours une compétition entre plusieurs recombinants. En effet, avec ce seul marqueur de sélection, peuvent subsister dans la même suspension sous pression de sélection:

- Double Rec NSmG2FVR-HPPR et Simple Rec KS1-HPPR
- Double Rec NSmG2FVR-HPPR , Simple Rec KS1-HPPR, Simple Rec KS1-NSmG2FVR

Ces constatations nous ont orienté vers un autre type de sélection basé sur un autre procédé, celui des billes magnétiques sur lesquelles sont greffés des anticorps spécifiques des virus à purifier, les Carboxyle Adembeads (Ademtech, France).

La mise au point de cette méthode a conduit à définir les conditions optimales de greffage des billes par différents types d'anticorps (monoclonaux ou polyclonaux). Les meilleures conditions de greffage des anticorps anti-FVR sont les anticorps monoclonaux anti-glycoprotéines (I. Pasteur, Paris) ou polyclonaux (zébus mahorais naturellement infecté P75) à raison de 60 µl et de 50 µl (tableau 6). Les mêmes concentrations ont été envisagées pour les anticorps monoclonaux anti-HPPR. Il est important de rappeler ici que l'utilisation des Adembeads dépend essentiellement de l'expression des protéines virales, qui doit se faire en surface des cellules infectées, au niveau de leurs membranes cytoplasmiques. Ces expériences préliminaires permettant de confirmer que la protéine G2 et HPPR sont bien exprimées en surface ont été réalisées et permettent donc de penser que des Adembeads coatées avec des anticorps anti-FVR pourront capter les protéines virales NSmG2 exprimées en surface des cellules infectées OA3.Ts. La figure 62 présente l'expression de la glycoprotéine G2 au niveau des cellules infectées par le recombinant, après perméabilisation/fixation des cellules par acétone (a). Les cellules étant traitées préalablement à l'acétone pour leur fixation, on ne peut déterminer l'emplacement exacte de cette expression. Dans le cas où le tapis cellulaire n'est pas perméabilisé (b), l'expression de la G2 suite à une transfection des cellules par le virus est mise en évidence au niveau de la surface cellulaire de façon très nette. Ces résultats sont encourageants pour utiliser cette technologie Adembeads. Il reste à confirmer que les protéines H de la PPR sont elles aussi, bien exprimées en surface des cellules pour continuer dans cette voie de purification.





**Expression de G2 sur tapis cellulaire perméabilisé**

**Expression de G2 sur tapis cellulaire non perméabilisé  
Mise en évidence de la G2 à la surface de membrane cellulaire**

**Figure 62 :** Expression de la glycoprotéine G2 par IF. a. Expression de la G2 sur tapis cellulaire perméabilisé à l'Acétone. b. Expression de la G2 sur tapis cellulaire non perméabilisé, à la surface des membranes cellulaires.

## Conclusion

Treize capripoxvirus simple recombinants pour la FVR ont été générés à partir du pKSCATPSGPT-NSmG2 et du KS1 dont deux ont été purifiés et identifiés sous KS 5.1.3 et KS 5.5.7. Concernant le capripoxvirus double recombinant, bien que 6 clones et notamment les clones identifiés R3.3.4 et R3.4.3 aient été obtenus, la méthode de sélection par pression sélective n'a pu aboutir à les purifier. La technologie utilisant les billes de type Carboxyle Adembeads est en cours. D'autres stratégies de sélection pour permettre une purification facile du double recombinant sont à réfléchir.

Ainsi, en fonction de ces résultats, seul le pouvoir protecteur du simple recombinant FVR obtenu à partir du plasmide pKSCATPSGPT-NSmG2 sera évalué en expérimentations animales chez la souris et la chèvre avec un suivi de la réponse immunitaire engendrée.



## Chapitre 2 - Démonstration de l'effet protecteur des capripoxvirus recombinants FVR *in vivo* avec la construction capripoxvirus simple recombinant FVR

Un grand nombre de recherches sur la souche vaccinale atténuée du virus de la dermatose nodulaire contagieuse ont été menées ces vingt dernières années. Deux souches sont couramment utilisées dans des campagnes de vaccination, la souche Neethling (origine Afrique du Sud) et la souche KS-1 (origine Afrique de l'Ouest). La souche Kenyan Sheep-1 (KS-1), thermorésistante a notamment été utilisée pour l'expression de gènes des virus de la peste bovine, de la peste des petits ruminants et de la fièvre catarrhale ovine (Romero *et al.*, 1993 ; Romero *et al.*, 1994 ; Wade-Evans *et al.*, 1996 ; Berhé *et al.*, 2003 ; Perrin *et al.*, 2007). Des données générées après vaccinations en conditions expérimentales ou de terrain avec la souche KS-1 ont confirmé l'innocuité et le pouvoir de diffusion très limité, son pouvoir pathogène résiduel se caractérise par des lésions nodulaires disparaissant en quelques jours chez la chèvre et le mouton (Romero *et al.*, 1993). Une étude a pu montrer des effets indésirables chez certaines races sensibles de bovins laitiers qui sont dans des conditions hormonales spécifiques (Yeruham *et al.*, 1994).

L'objectif du second chapitre de cette troisième partie est d'évaluer l'effet immunogène des constructions de capripoxvirus recombinants élaborés à partir du gène M de la souche ZH548 du virus de la FVR. Il est à noter ici que les essais expérimentaux vaccinaux nécessitent la mise au point de l'épreuve infectieuse avec le virus FVR, qui ne peut avoir lieu que dans un laboratoire de confinement P3. La souche virulente de FVR à utiliser, la charge ainsi que la voie d'inoculation sont autant de facteurs qui rendent difficiles la reproduction de la maladie dans des conditions expérimentales avec une reproduction des signes de pathologie observés (virémie, observation de signes cliniques). Un certain nombre de souches ont été utilisées sur différents modèles, le modèle murin outbred NIH Swiss par la souche VRL 688/78 par voie intrapéritonéale et intrascanale (Heise *et al.*, 2009), des souris transgéniques Balb/c, H2d haplotype,  $\alpha$ 1,3 galactosyltransférase-KO par voie intra-péritonéale avec la souche RVF ZH501 (Mandell *et al.*, 2010), des rats Wistar-Furth avec la souche ZH 501 par voie sous-cutanée (Mandell *et al.*, 2010), des souris Balb/c avec la souche ZH548 (Lagerqvist *et al.*, 2009), la souche M35/74 (Koertekaas *et al.*, 2010b), ou la souche isolée de moustiques AR20368 (Wallace *et al.*, 2006), des souris C57BL/6 (ScanBur BK) avec la souche ZH 548 par voie i.p. (Näslund *et al.*, 2009). Les exemples sont nombreux et illustrent la complexité de

reproduire les signes cliniques observés lors d'une infection naturelle par des expérimentations animales.

L'évaluation de notre capripoxvirus recombinant n'a pour autant pu se faire que par le biais d'expérimentations animales, ceci avec deux modèles bien distincts : le modèle murin qui nous permis de tester l'effet protecteur de notre candidat vaccinal et le modèle caprin qui nous a permis d'évaluer l'immunogénicité (réponses humorales et cellulaires) de notre construction.

Pour le modèle murin MBT/Pas, deux expérimentations ont été menées dans les animaleries de confinement 3 (A3) dans l'unité de génétique fonctionnelle de la souris dirigée par J.J. Panthier en collaboration avec l'unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus dirigée par M. Bouloy, à l'institut Pasteur à Paris .Une première expérimentation animale a été envisagée chez les souris MBT/Pas, lignées de souris sauvages sensibles au virus de la FVR (Do Valle et al., 2010) afin d'évaluer la dynamique des réponses cellulaires induites d'une part, et la protection d'autre part, suite à l'immunisation de ces souris avec notre candidat vaccinal capripoxvirus recombinant et une épreuve virulente avec la souche sauvage humaine ZH 548, 1977. Une seconde expérimentation animale, avec le même schéma d'immunisations chez des souris de mêmes lignées a été conduite, avec des modifications au niveau de la quantité de recombinant injectée (10 fois supérieure) et les voies d'immunisations (voie intrapéritonéale en supplément), ces 2 expérimentations nous ont permis de statuer sur l'effet protecteur de notre candidat vaccin.

Pour le modèle caprin, l'expérimentation animale menée dans l'animalerie A2 du CIRAD, campus de Baillarguet a permis d'évaluer l'immunogénicité de la construction capripoxvirus comportant les gènes NSmG<sub>N</sub> du virus de la FVR avec un suivi des réponses humorales et cellulaires.

## 1 - Modèle souris MBT/Pas : Immunisations avec la construction vaccinale simple recombinant NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> du virus FVR suivies d'une épreuve infectieuse

### 1.1. Matériel et méthodes

#### 1.1.1. Modèle d'étude

Afin d'évaluer l'effet protecteur de la construction vaccinale capripoxvirus simple recombinant NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> pour la FVR, deux essais expérimentaux ont été conduits chez la souris. La lignée murine *Mus m. musculus* utilisée pour nos essais (figure 63) a la particularité d'être résistante à l'infection par le virus West Nile et le virus Influenza de type A alors qu'elle s'avère être une lignée très sensible et mimant les signes cliniques avec une forte et précoce virémie suivant l'infection aboutissant à une mort rapide. Cette observation est vraisemblablement due à un échec de cette lignée murine à induire une réponse immunitaire innée complète (Do Valle *et al.*, 2010).



**Figure 63** : Souris de la lignée MBT/Pas utilisée lors de nos essais expérimentaux

Deux expérimentations consécutives ont été menées avec des variations en terme de charge virale de la construction vaccinale administrée (10<sup>4.9</sup> versus 10<sup>5.9</sup>) ainsi que les modes d'administration (s.c. et i.m. versus i.p., i.m., et s.c.).

Les figures 64 et 65 présentent les calendriers expérimentaux de chacune des 2 expérimentations.

#### Expérimentation No 1 :

Trente-six souris femelles (*Mus m. musculus* MBT/Pas) âgées de 5 à 6 semaines hébergées en animalerie de confinement 3 (Institut Pasteur, Paris) ont été réparties en trois groupes :

- le **Groupe A** composé de 12 souris, a été inoculé par voie sous cutanée à J0 avec une dose de 10<sup>4.9</sup> DICT<sub>50</sub> puis par voie sous-cutanée (50%) et intrapéritonéale (50%) à J21 avec la même dose de 10<sup>4.9</sup> DICT<sub>50</sub> de la construction vaccinale capripoxvirus-H-PPR,

le gène H exprimé correspond au gène codant pour l'hémagglutinine du virus de la peste des petits ruminants. Cette construction, considérée comme irrelevante dans notre essai a déjà été montrée comme protectrice contre une épreuve infectieuse PPR chez les petits ruminants (Diallo *et al.*, 2002 ; Berhé *et al.*, 2003).

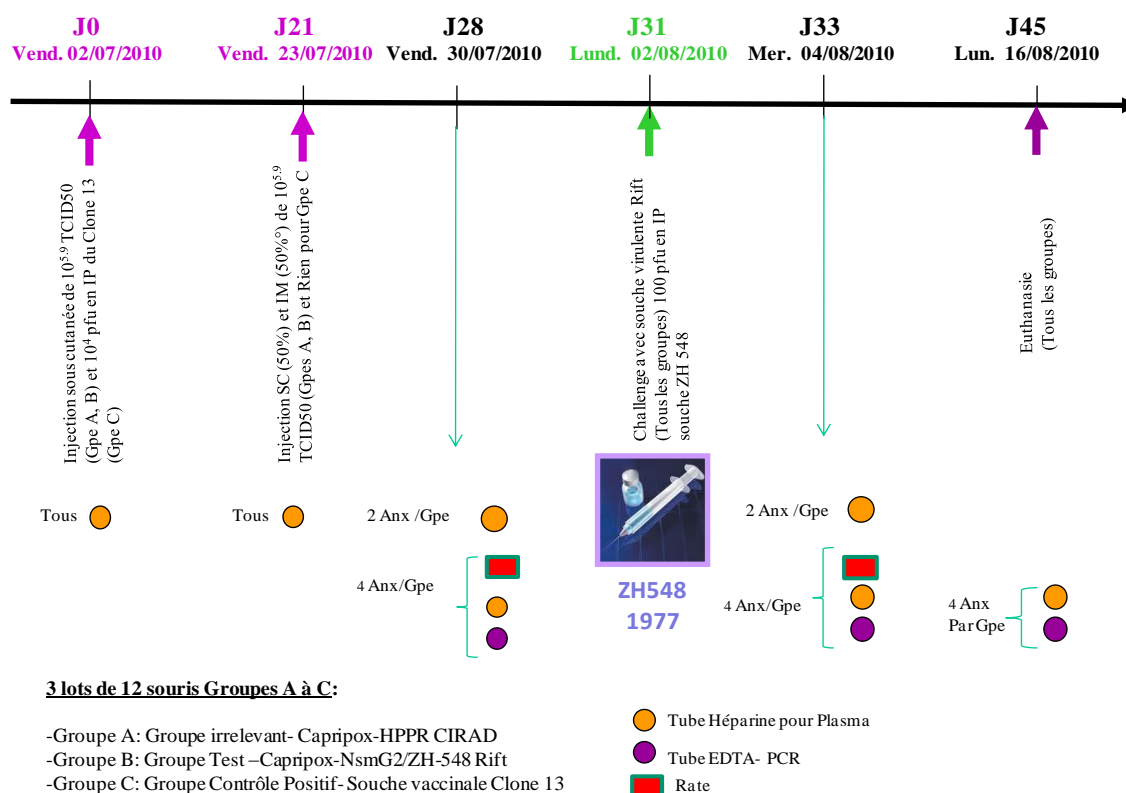
- le **Groupe B** composé de 12 souris, a été inoculé par voie sous cutanée à J0 avec une dose de  $10^{4.9}$  DICT<sub>50</sub> puis par voie sous-cutanée (50%) et intrapéritonéale (50%) à J21 avec la même dose de  $10^{4.9}$  DICT<sub>50</sub> de la construction vaccinale candidate NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> du virus FVR. Cette construction est considérée comme la construction candidate protégeant contre la FVR et comportant le gène G<sub>N</sub> contenant les épitopes neutralisants.
- le **Groupe C** composé de 12 souris également, a été inoculé par voie intra péritonéale avec une dose de  $10^4$  pfu à J0. Ce groupe correspond au groupe témoin positif, le clone 13 étant un très bon candidat vaccinal pour lequel l'effet protecteur a déjà été validé dans d'autres modèles expérimentaux (Dungu *et al.*, 2010)

Trente et un jours suivant la première administration (J0), les souris ont subi une épreuve infectieuse avec une dose de 100 pfu par voie intra péritonéale avec la souche ZH548, 1977 isolée des foyers épidémiques égyptiens (Meegan *et al.*, 1979)

Les souris ont fait l'objet de prélèvements de sang sur tubes secs, une fois par semaine dès le jour de l'immunisation (J0). Les tubes secs sont mis à décanter à +4°C, puis le sérum est récolté, aliquoté et stocké à -20°C pour recherche d'anticorps.

Afin d'évaluer les réponses cellulaires, les rates de 4 animaux par groupe ont été prélevées et les lymphocytes extraits afin de procéder à leur mise en culture pour une restimulation in vitro pendant 4 jours avec du virus entier inactivé (KS-1 et FVR). Les cellules et le surnageant de culture sont prélevés à 4 jours puis stockés à -80°C pour recherche ultérieure de cytokines.

Enfin, des prélèvements de sang sur tubes EDTA sont effectués hebdomadairement dès le jour de l'immunisation afin d'évaluer la virémie post épreuve infectieuse.

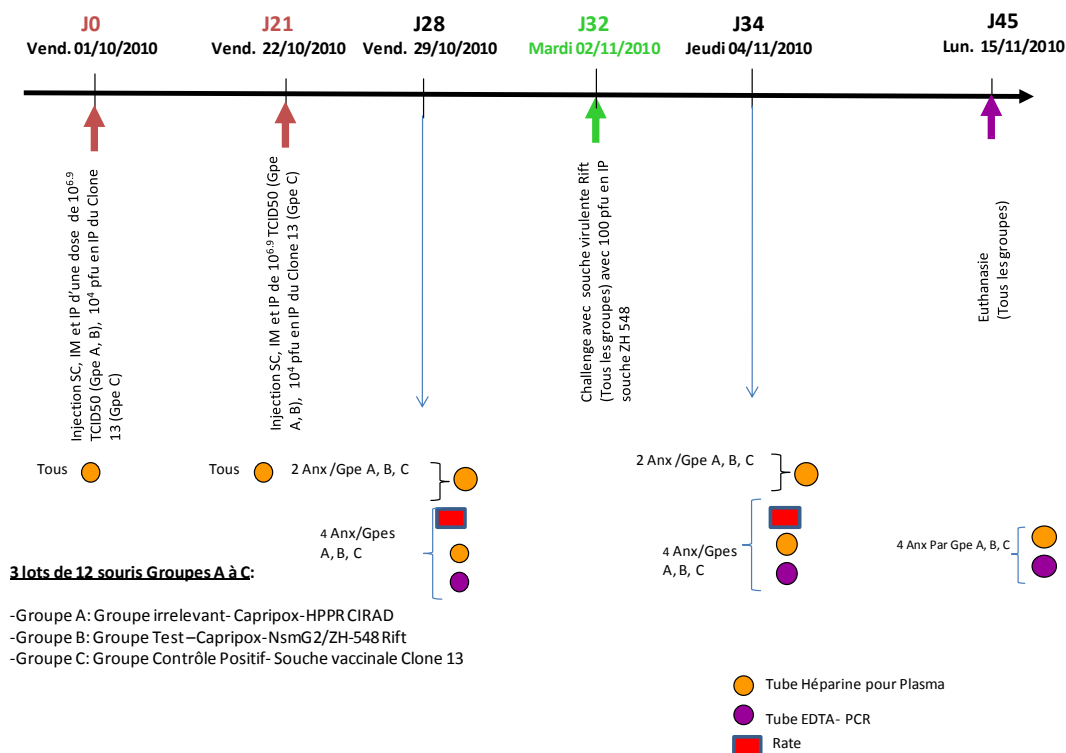


**Figure 64 :** Calendrier de la première expérimentation animale réalisée chez les souris MBT (Travaux effectués dans l'unité de génétique fonctionnelle de la souris dirigée par J.J. Panthier en collaboration avec l'unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus dirigée par M. Bouloy, Institut Pasteur, Paris)

## Expérimentation No 2 :

L'expérimentation No 2 suit exactement le même schéma que l'expérience No1 à savoir trente-six souris femelles (*Mus m. musculus* MBT/Pas) âgées de 5 à 6 semaines hébergées en animalerie de confinement 3 (Institut Pasteur, Paris) réparties en trois groupes : A, B, C comme décrit dans la figure 65 avec pour seules différences :

- la dose vaccinale administrée (groupes A et B) qui passe de  $10^{4.9}$  DICT<sub>50</sub> à  $10^{5.9}$  DICT<sub>50</sub>
- la voie d'administration qui était s.c.(J0), s.c., i.m (J21) et qui devient s.c., i.m, i.p. à J0 et J21.



**Figure 65 :** Calendrier de la seconde expérimentation animale réalisée chez les souris MBT (Travaux effectués dans l'unité de génétique fonctionnelle de la souris dirigée par J.J. Panthier en collaboration avec l'unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus dirigée par M. Bouloy, Institut Pasteur, Paris)

## 1.1.2. Méthodes

### 1.1.2.1. Evaluation de la réponse immunitaire de type humorale

La présence d'anticorps neutralisants anti-FVR dans les sérums prélevés en cinétique est testée par la technique de neutralisation virale, la présence d'anticorps anti-Cpox par immunofluorescence.

#### A - Recherche d'anticorps anti-FVR par neutralisation virale

Ces expériences ont été menées à l'Institut Pasteur, Paris par l'équipe du Dr Michèle Bouloy. Les sérums sont dilués en duplicate, du  $1/5^{\text{ème}}$  jusqu'au  $1/320^{\text{ème}}$ , dans un volume de 100  $\mu$ l en milieu MEM (Gibco) sans sérum puis sont mis en contact avec 100 TCID<sub>50</sub> de virus FVR souche ZH548 (contenu dans 100  $\mu$ l) en plaques 96 puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C, ce complexe sérum/virus est ajouté dans chaque puits sur un tapis cellulaire de  $1.2 \times 10^5$  cellules VERO préparées la veille, les plaques sont incubées à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 5 à 10 jours. Les résultats obtenus sont exprimés en titre viral et correspondent à l'inverse de la dilution la plus haute donnant 50 % d'ECP. Les sérums avec des titres supérieurs à 5 sont considérés comme positifs. Une plaque contrôle réalisée à chaque série

d'essais permet de valider la dose virale de 100 TCID<sub>50</sub> de virus FVR ajoutées dans chacun des puits.

### ***B- Recherche d'anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence***

Des plaques de culture 96 puits (Nunc) sont préparées à raison de  $2.5 \times 10^4$  cellules OA3Ts en milieu DMEM avec 10% de SBF par puits. Le jour suivant, les cellules à confluence, sont infectées avec le KS-1 avec une dose de 100 TCID<sub>50</sub>/ml. Le virus est laissé en contact avec les cellules pendant 2 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> puis du milieu de culture complet est ajouté. Après 48h d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont fixées pendant 30 minutes à -20°C en acétone 80%.

Les cellules sont perméabilisées 30 minutes avec du Triton 100X à 0,2% puis incubées 20 minutes à 37°C avec un tampon de blocage (PBS1X, gélatine 0,2%). Les sérums caprins et ovins sont ajoutés en double à une dilution au 1/50<sup>ème</sup> (dans du tampon de blocage), pendant 30 minutes à 37°C. Après trois rinçages avec du tampon de blocage des anticorps anti-chèvre-FITC ou anti-mouton-FITC (F0250 et F0135, respectivement - Dako, USA) sont ajoutés au 1/50<sup>ème</sup> dans du tampon de blocage. Après trois rinçages en PBS, l'observation de la fluorescence est effectuée au microscope (Nikon, eclipse TE300). Des cellules non infectées servent de témoins négatifs.

#### *1.1.2.2. Evaluation de la réponse immunitaire de type cellulaire*

La réponse immunitaire de type cellulaire a été évaluée au travers de deux aspects :

- l'estimation de la prolifération et le typage des sous populations lymphocytaires après restimulation avec le virus entier inactivé souche FVR Smithburn, group 39, 1974.
- le dosage de cytokines au niveau protéines à partir des surnageants de culture restimulés *in vitro*.

Dans ce but, les cellules spléniques ont été isolées à partir de rates prélevées et transportées dans un milieu de transport (RPMI1640 (Gibco) +5% SBF+ EDTA 2 mM+ gentamycine 50 µg/ml). Après un broyage de la rate de façon stérile dans une boîte de Pétri avec le piston d'une seringue de 10 ml sur un morceau de gaze de type Blutex (Saatifil polyamide ref 90/35), les cellules sont lavées et resuspendues dans du milieu RPMI (Sigma, USA) enrichi à 10% SBF et 1% L-glu. Un marquage de ces cellules avec un traceur cellulaire, le CFSE (CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester – Molecular Probes, USA) est effectué et permet de suivre la prolifération cellulaire suivie d'une remise en culture des

cellules pour une restimulation in vitro avec le virus entier FVR inactivé aux UV pendant 30 minutes (Crosslinker UV) à raison d'une MOI de 5. Le contrôle négatif est du milieu de culture seul. Le contrôle positif est du milieu de culture contenant un mitogène, la concanavaline A à la concentration finale de 5 µg/ml (ConA, Sigma, USA).

#### Estimation de la prolifération et typage des sous populations lymphocytaires :

L'activation et la prolifération des cellules sont évaluées par passage au cytomètre en flux (FACSort, Becton Dickinson) en utilisant les paramètres FSC x SSC, FL1 x FSC et FL1 x FL2. Tous les lymphocytes quiescents présentent une apparence uniforme de cellules rondes de petite taille avec un noyau dense et peu de cytoplasme. Les lymphocytes activés se multiplient rapidement et forment des structures appelées blastes. Afin de phénotyper et quantifier les sous-populations fonctionnelles (lymphocytes T CD4, lymphocytes T CD8), des marquages spécifiques sont effectués (tableau 11). Les anticorps marqués Phycoerytherin (PE) (marquant les CD4, CD8 ou témoin négatif isotype control) sont incubés avec les cellules pendant 20 minutes à +4°C. Le témoin négatif isotype control permet d'évaluer le bruit de fonds lié à une éventuelle autoproliération des cellules. Les cellules sont lavées et analysées au cytomètre en flux à l'aide du logiciel CellQuest 3.01. Les informations apportées par la cytométrie en flux concernent la taille (Forward Scatter – FSC), la granularité (Side Scatter – SSC) et l'intensité de fluorescence émise par la cellule (FL-1, FL-2 dans notre cas). Les différents fluorochromes utilisés émettent sur des longueurs d'ondes différentes. Ainsi, FITC émet sur FL-1 à une longueur d'onde de 515 nm, PE émet sur FL-2 à 585 nm. Lors de l'acquisition des données, chaque évènement apparaît sous forme d'un point. Après 10 000 évènements, on obtient un nuage de points, ou dot plot, représentatif des populations cellulaires acquises. L'analyse de ces populations cellulaires pourra se faire en fonction des caractéristiques physiques des cellules (FSC / SSC) ou de la fluorescence émise (FSC / FL-1 ou FL-2 pour un simple marquage; FL-1/ FL-2 pour un double-marquage).

Les valeurs obtenues pour les différents groupes sont comparées par le test de Kruskal et Wallis. Une valeur de probabilité  $p < 0.05$  est considéré comme significative.

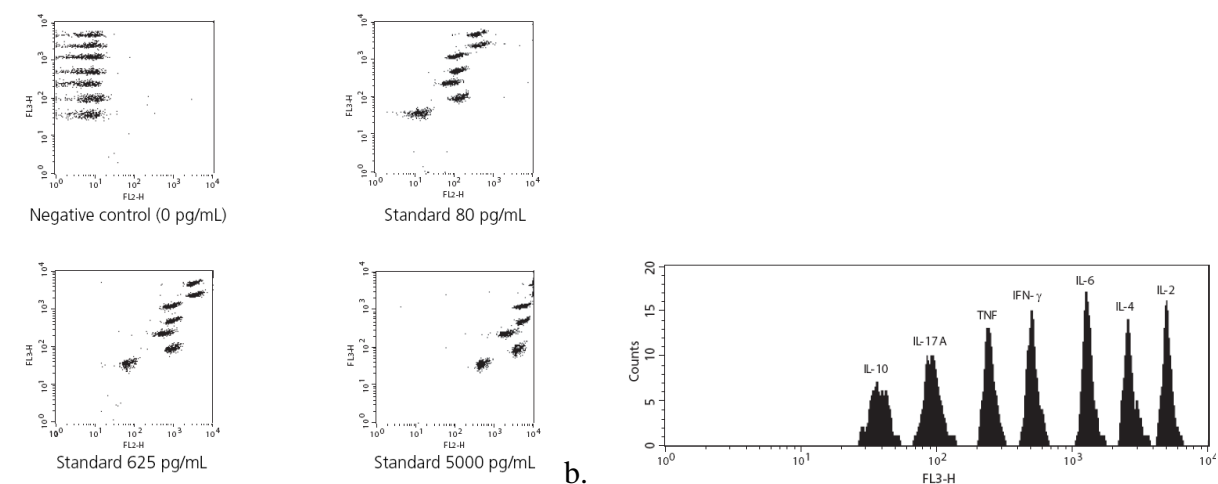


Cellules cibles	Anticorps utilisés, dilution 1/200
Lymphocytes T CD4	Anti-CD4 PE (BD, Cat 553049)
Lymphocytes T CD8	Anti-CD8PE (BD, Cat 553033)
Isotype Control	IgG2a-PE (BD, Cat 553457)

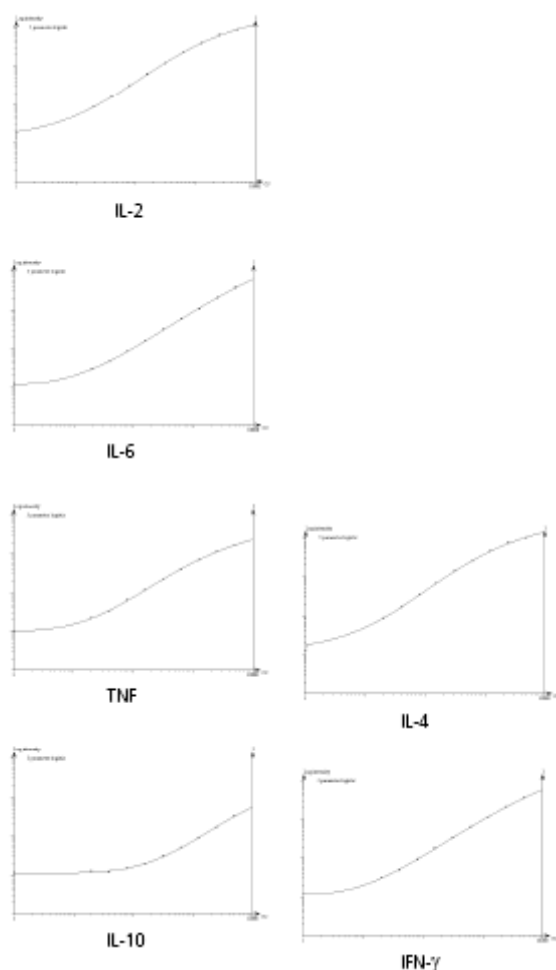
**Tableau 11:** Liste des Anticorps utilisés pour le typage des populations lymphocytaires chez la souris

### Dosage de cytokines :

Les surnageants de culture sont récoltés après 4 de re-stimulation ont permis le dosage des cytokines de type Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et TNF). La technologie CBA (Cytometric Bead array, BD, Cat 551287 USA) à raison de 50 µl par échantillon. Le principe du dosage des cytokines par ce kit repose sur l'incubation d'un mélange de 5 sortes de billes qui a été précoatées avec des anticorps de capture spécifiques des cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et TNF, détectables sur le canal rouge (FL3 ou FL4 du cytomètre). Les billes sont ensuite incubées avec des anticorps marqués à la phycoérythrine (PE) d'une part et avec soit une courbe standard pour chacune des cytokines soit les échantillons à tester pendant 2 heures à température ambiante. Après incubation, les billes sont lavées puis analysées au cytomètre de flux VEGF. En fonction de la valeur obtenue pour la courbe standard, une valeur est calculée pour chacun des échantillons avec le logiciel FCAP Array<sup>TM</sup>. Un exemple de résultats est donné sur les figures 66 et 67 ci-dessous.



**Figure 66 :** Technologie BD CBA. Représentation graphique de la gamme standard pour 3 points 0, 80, 625 et 5000 pg/ml (a), des différents pics spécifiques de chacune des cytokines testées, dans notre cas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et TNF (b).



**Figure 67 :** Technologie BD CBA. Représentation graphique de la gamme standard pour chacune des cytokines testées, dans notre cas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et TNF.

### 1.1.2.3. Evaluation de la protection

#### *A - Recherche virale*

Des prélèvements de sang sur EDTA sont effectués 3 jours avant l'épreuve (J28) puis 2 jours après l'épreuve (J33) et le jour de l'euthanasie (J45). La détection du virus se fait par RT-PCR sur le segment NSs directement à partir d'ARN extrait du sang (Garcia *et al.*, 2001).

#### *B - Survie après épreuve virulente*

Au cours de l'expérimentation sur le modèle souris MBT/Pas avec la souche virulente ZH548, 1977 par voie IP du virus FVR, l'apparition des signes cliniques est difficilement quantifiable,

la mort des animaux est subite en quelques heures. La protection des animaux a donc été quantifiée en termes de survie/mort.

## 1.2. Résultats

### 1.2.1. Evaluation de la réponse humorale

#### 1.2.1.1. Détection des anticorps anti-Capripoxvirus par IF

Les souris en général n'étant pas des hôtes sensibles aux capripoxviroses, les analyses réalisées sur les différents sérums issus des souris de lignée MBT :Pas n'ont pas permis de conclure à une séroconversion spécifique du KS1. Un bruit de fond assez important a été observé lors de la lecture au microscope à fluorescence avec une interprétation difficile.

#### 1.2.1.2. Détection des anticorps anti-FVR par SNT

Les anticorps anti-FVR sont détectés par un test de neutralisation virale.

#### Expérimentation 1 :

Les titres viraux obtenus à partir des sérums de la première expérimentation animale ont été inférieurs à 5 pour les groupes CpoX-HPPR et CpoX RIFT. Ils étaient en revanche fortement positifs pour le groupe Clone 13 (Tableau 12).

Groupes	Identifiants		J 28
Cpox-H PPR	Cage 1	NM	<5
		G	<5
		GG	<5
		DD	<5
	Cage 2	DD	<5
		GD	<5
Cpox-RIFT	Cage 3	NM	<5
		G	<5
		D	<5
		GD	<5
		GG	<5
		DD	<5
Clone 13	Cage 5	NM	>100
		G	>100
		D	>100
		GD	>100
		GG	>100
		DD	>100

**Tableau 12:** Titres viraux obtenus en FVR par neutralisation virale lors de la première expérimentation chez les souris immunisées par le capripoxvirus CpoX-NSmG<sub>N</sub> recombinant FVR (Groupe Test) et le capripoxvirus CpoX-H-PPR (Groupe Témoin). Un groupe témoin positif composé du vaccin Clone 13 développé par l'Institut Pasteur. Un Titre >5 est considéré comme positif.

### Expérimentation 2 :

Le tableau 13 présente les titres obtenus en anticorps neutralisants en FVR de chacune des souris testées à J28, c'est-à-dire 1 semaine après la dernière immunisation et 3 jours avant l'épreuve infectieuse. Un Titre >5 est considéré comme positif.

Pour toutes les souris du groupe témoin ayant reçu le Cpox-HPPR, aucun anticorps neutralisant n'a été décelé. En revanche, des titres d'anticorps neutralisants variant de 5 à 30 ont été détectés pour 6 des 8 souris du groupe Cpox-FVR.. Les titres viraux obtenus pour ce groupe sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour le groupe témoin à J28 (test Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Une séroconversion a été largement détectée pour toutes les souris du groupe Témoin positif (Clone 13).

Groupes	Identifiants		J 28
Cpox-H PPR	Cage 1	NM	<5
		G	<5
		D	<5
		GD	<5
		GG	<5
		DD	<5
Cpox-RIFT	Cage 3	NM	15
		G	<5
		D	15
		GD	30
		GG	<5
		DD	5
	Cage 4	NM	30
		G	25
Clone 13	Cage 5	NM	160
		G	80
		D	320
		GD	160
		GG	80

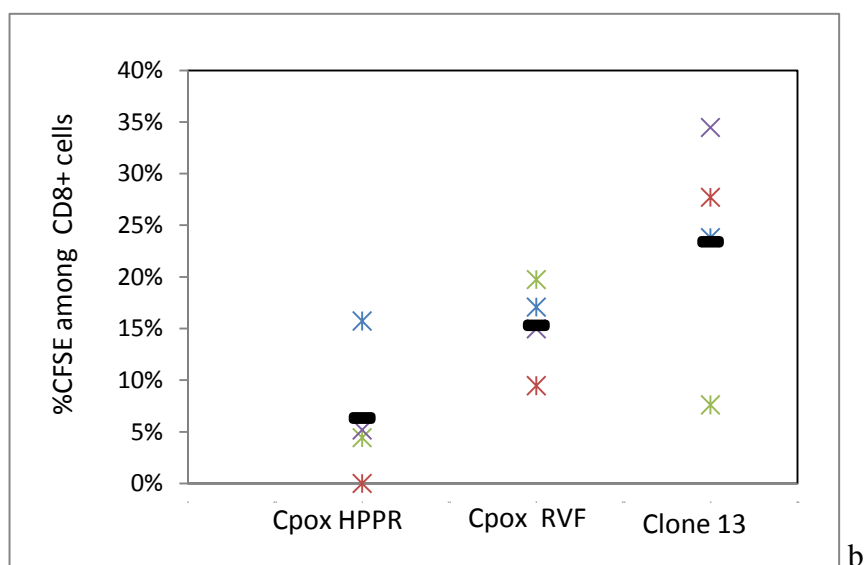
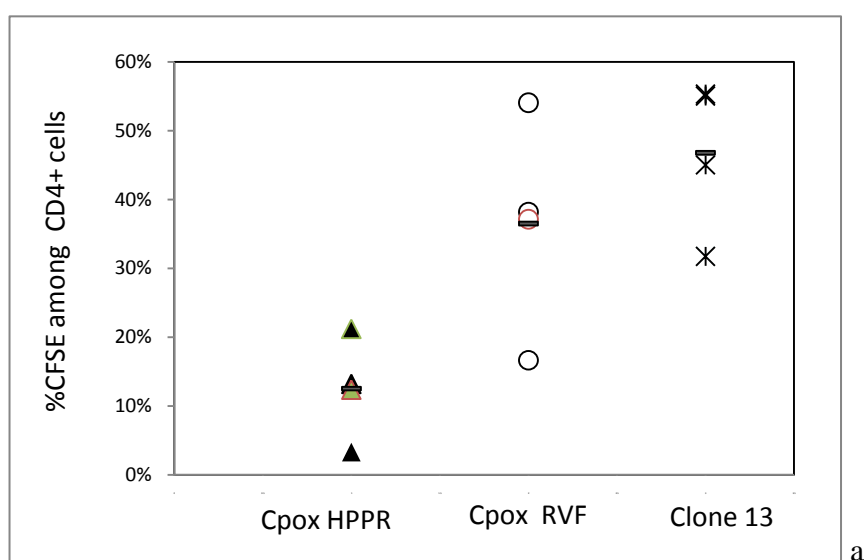
**Tableau 13:** Titres viraux obtenus en FVR par neutralisation virale lors de la seconde expérimentation chez les souris immunisées par le capripoxvirus Cpox-NSmG<sub>N</sub> recombinant FVR (Groupe Test) et le capripoxvirus Cpox-H-PPR (Groupe Témoin). Un groupe témoin positif composé du vaccin Clone 13 développé par l'Institut Pasteur. Un Titre >5 est considéré comme positif.

## 1.2.2. Evaluation de la réponse cellulaire

### 1.2.2.1. Etude de la lymphoprolifération

#### Expérimentation 1 :

La figure 68 (a et b) présente les résultats de prolifération observée après épreuve infectieuse à J+33 après restimulation pendant 5 jours avec le capripoxvirus KS-1 et le virus FVR respectivement. Chacun des 3 groupes de souris ont été immunisés soit avec du Capripoxvirus irrelevant HPPR ( groupe témoin), soit avec du capripox CpoX-NSmG<sub>N</sub> FVR (groupe Test) soit avec du Clone 13 (Témoin positif) . Une différence significative (test Mann et Whitney,  $p < 0.05$ ) est observée à ce point J+33 (2 jours après l'épreuve infectieuse) entre le groupe Test et le groupe Témoin, et entre le groupe Témoin positif et le groupe Témoin irrelevant aussi bien pour les sous-populations lymphocytaires de type CD4 (figure 68a) que CD8 (figure 68b).



**Figure 68 :** Prolifération des lymphocytes de type CD4 (a) et de type CD8 (b) après restimulation avec les préparations antigéniques de virus FVR. Les barres horizontales représentent les moyennes de chaque groupe.

### Expérimentation 2:

Les résultats de la réponse cellulaire obtenus pour la seconde expérimentation sont inexploitable suite à l'apoptose cellulaire observée lors de la restimulation antigénique des cellules spléniques fraîches ou décongelées avec les préparations antigéniques spécifiques du virus KS1 ou FVR.

#### 1-2-2-1 Evaluation des réponses cytokines

Le dosage des cytokines en tant que protéines sécrétées a été réalisée à partir de surnageants de culture récoltés après restimulation in vitro par des préparations antigéniques spécifiques KS1 ou FVR (RVF) de splénocytes isolés à partir des rates des souris immunisées. La technologie CBA a été utilisée à cet effet et a permis de doser les cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  et TNF $\alpha$  à partir de 50  $\mu$ l de surnageant.

Les résultats exprimés en pg/ml sont présentés dans le tableau 14 pour l'expérimentation 1 et le tableau 15 pour l'expérimentation 2.

### Expérimentation 1:

RVF	pg/ml	mouse IL-2	mouse IL-4	mouse IL-5	mouse IFN $\gamma$	mouse TNF $\alpha$
Souris 1	Cpox-HPPR	45,79	0	1,33	5,86	59,24
Souris 2	Cpox-HPPR	62,93	27,93	10,91	9,33	188,45
Souris 3	Cpox-HPPR	54,23	0	0	7,63	89,5
Souris 4	Cpox-HPPR	4,5	0	0,7	0	122,91
Souris 5	Cpox-RVF	21,64	222,24	4,17	6,72	12,26
Souris 6	Cpox-RVF	33,14	385,86	8,37	3,04	64,76
Souris 7	Cpox-RVF	46,88	20,02	5,35	8,36	0
Souris 8	Cpox-RVF	0	0	0	0	0
Souris 9	Clone 13	29,1	1051,21	8,57	1,84	0
Souris 10	Clone 13	0	107,13	11,45	4,87	0
Souris 11	Clone 13	0	0	3,01	0	73,55
Souris 12	Clone 13	0	0	1,22	2,66	35,59

**Tableau 14 :** Dosage des cytokines sécrétées à partir des surnageants de culture restimulés in vitro pour l'expérimentation 1.

En ce qui concerne l'expérimentation 1, aucune différence significative n'est obtenue entre les 3 groupes de souris quelque soient les cytokines dosées.

## Expérimentation 2:

RVF	pg/ml	mouse IL-2	mouse IL-4	mouse IL-5	mouse IFN $\gamma$	mouse TNF $\alpha$
Souris 1	Cpox-HPPR	0	0	0	0	0
Souris 2	Cpox-HPPR	0	0	0	0	0
Souris 3	Cpox-HPPR	0	0	0	0	0
Souris 4	Cpox-HPPR	0	0	0	0	0
Souris 5	Cpox-RVF	0	0	0	0	0
Souris 6	Cpox-RVF	0	0	0	0	0
Souris 7	Cpox-RVF	0	0	0	0	0
Souris 8	Cpox-RVF	0	0	0	0	0
Souris 9	Clone 13	0*	0*	0	0*	0
Souris 10	Clone 13	4,78*	463,97 *	0	0,23*	0
Souris 11	Clone 13	41,34*	2125,22*	4,12	0,58*	84,22
Souris 12	Clone 13	18,2*	590,41*	1,3	1,28*	22,58

**Tableau15** : Dosage des cytokines sécrétées à partir des surnageants de culture restimulés in vitro pour l'expérimentation 2. Test Mann-Whitney \*  $p < 0.05$

Les résultats obtenus pour l'expérimentation 2 montrent la présence de cytokines IL-2, IL-4 et IFN- $\gamma$  à des taux statistiquement supérieurs dans le groupe de souris qui a reçu le vaccin Clone 13 à base de virus atténué ayant perdu la majeure partie du gène NSs comparativement aux 2 autres groupes Cpox-HPPR et Cpox-RVF. Un profil de type Th0 semble donc appuyer ces résultats.

### **1.2.3. Evaluation de la protection**

#### *1.2.3.1. Détection du génome viral*

La détection du virus s'est faite par RT-PCR sur le segment NSs directement à partir d'ARN extrait du sang prélevé 3 jours avant l'épreuve (J28) puis 2 jours après l'épreuve (J33) et le jour de l'euthanasie (J45). Les analyses sont en cours.

#### *1.2.3.2. Pathologie/Survie après épreuve virulente*

L'apparition et l'évaluation quantitative des signes cliniques suite à l'épreuve infectieuse avec la souche virulente ZH548, 1977 par voie IP du virus FVR, l'apparition des signes cliniques est fugace et la mort arrive très vite. La protection des animaux, quantifiée en termes de survie/mort est présentée dans les Tableaux 16 et 17 pour les 2 expérimentations successives respectivement.



MBT/Pas		Jours post épreuve infectieuse		
		J+3	J+5	J+8
Groupe Témoin Irrelevant Cpox-PPR	1-DD	-	-	-
	1-GD	+		
	2-GG	+		
	2-DD	+		
Groupe Test Cpox-FVR	3-DD	-	+	-
	3-GG	-	-	+
	4-G	-	-	+
	4-NM	-	-	-
Groupe Témoin Positif Clone 13	5-GG	-	-	-
	5-DD	-	-	-
	6- NM	-	-	-
	6- G	-	-	-

**Tableau 16** : Suivi de la mortalité des souris MBT/Pas suite à l'épreuve infectieuse FVR lors de la première expérimentation. Le signe « - » signifie survie des animaux, le signe « + » signifie leur mortalité.

Les 4 souris qui ont été suivies en cinétique appartenant au groupe Témoin positif (inoculé avec le vaccin clone 13) ont toutes survécu, ce qui était attendu et qui valide l'expérimentation. Trois des 4 souris appartenant au groupe Témoin Irrelevant (inoculé avec la préparation Cpox-HPPR) sont mortes dès J+3 post épreuve infectieuse. Une des 3 souris a survécu. En ce qui concerne les 4 souris du groupe Test inoculées avec le candidat vaccinal Cpox-FVR, une souris a survécu, et un retard net de la mortalité a été observé pour les 3 souris restantes.

Ces résultats fort encourageants nous ont conduit à lancer la seconde expérimentation qui possède le même schéma d'administration que la première avec une différence de nombre de doses injectées  $10^{6.9}$  au lieu de  $10^{5.9}$  ) et de voies d'injection (de sc, im à ip, im et sc), comme illustré dans la figure 65.

MBT/Pas		Jours post épreuve infectieuse			
		J+3	J+4	J+5	J+6
Groupe Témoin Irrelevant Cpox-PPR	1-GG	-	+		
	1-DD	-	+		
	2-NM	-	-	+	
	2-G	+			
Groupe Test Cpox-FVR	3-G	-	-	-	+
	3-GG	-	-	-	-
	4-G	-	-	-	-
	4-NM	-	-	-	-
Groupe Témoin Positif Clone 13	5-GG	-	-	-	-
	6- NM	-	-	-	-
	6- G	-	-	-	-

**Tableau 17** : Suivi de la mortalité des souris MBT/Pas suite à l'épreuve infectieuse FVR lors de la seconde expérimentation. Le signe « - » signifie survie des animaux, le signe « + » signifie leur mortalité.

Les 4 souris qui ont été suivies en cinétique appartenant au groupe Témoin positif (inoculé avec le vaccin clone 13) ont toutes survécu, résultat validant l'expérimentation. Les 4 souris appartenant au groupe Témoin Irrelevant (inoculé avec la préparation Cpox-HPPR) sont toutes de J+3 à J+5 post épreuve infectieuse. Enfin, trois des 4 souris du groupe Test inoculées avec le candidat vaccinal Cpox-FVR ont survécu, et une seule souris de ce groupe est morte à J+6. Les résultats obtenus lors de ces 2 expérimentations sont cohérents et en faveur d'une protection induite par notre préparation vaccinale de Cpox.

### 1.3. Conclusion

Les deux essais expérimentaux qui ont été conduits chez le modèle souris *Mus m. musculus* hypersensible à l'infection par le virus FVR, le modèle MBT/Pas nous ont permis de conclure quant à l'effet protecteur de notre construction vaccinale capripoxvirus simple recombinant **NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub>** pour la FVR. La première expérimentation où le groupe de souris Test a été administré à 2 reprises avec une dose virale  $10^{5.9}$  par voie sous-cutanée (J0) et voie sous-cutanée et intramusculaire (J21) a présenté un retard de mortalité de 2 à 5 jours comparativement au groupe irrelevant (Cpox-HPPR). La seconde expérimentation suivant le même schéma d'administration que la première avait pour différences la dose administrée  $10^{6.9}$  au lieu de

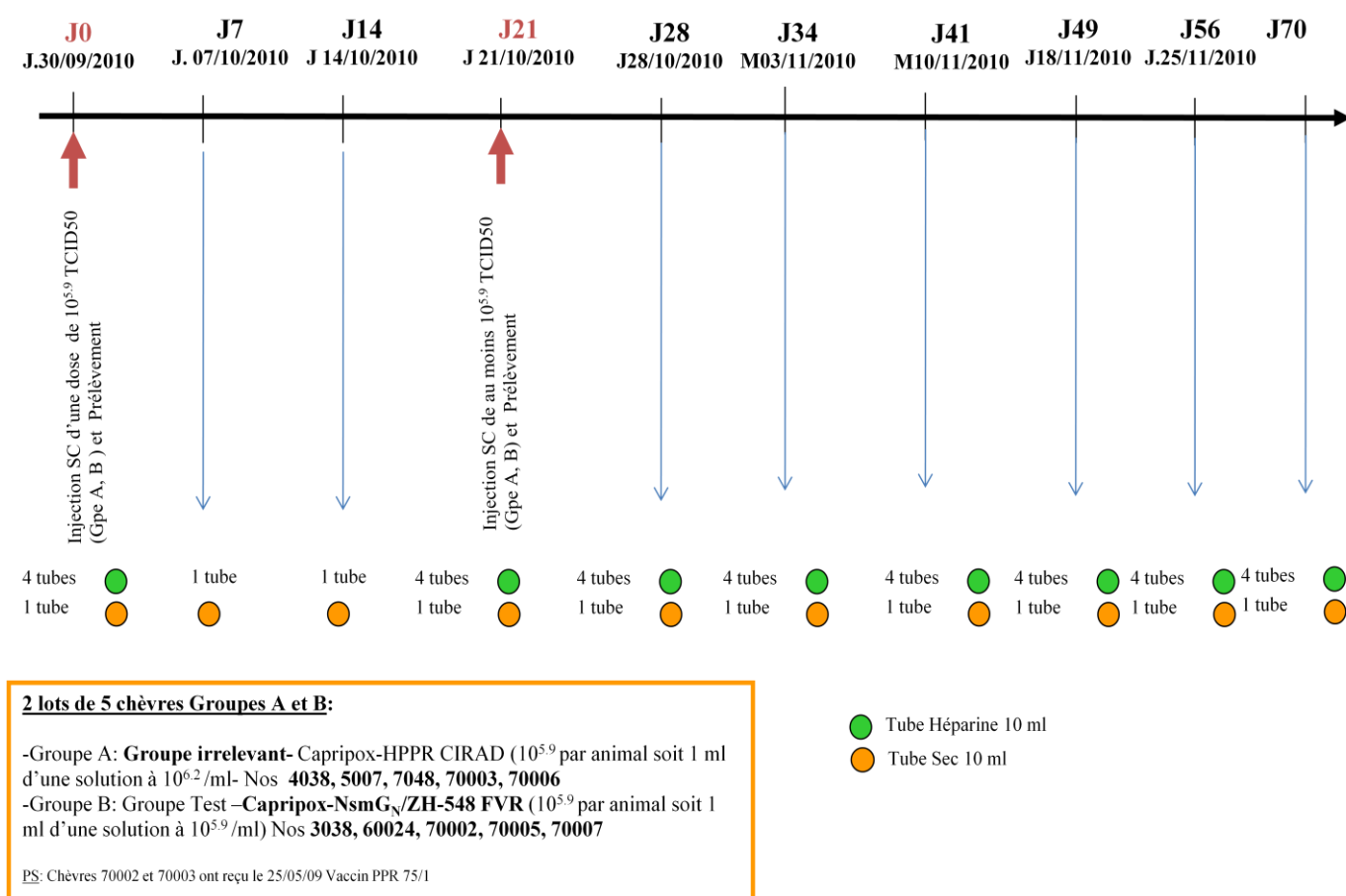
$10^{5.9}$  et les voies d'injection (passant de sc, im à sc, im et ip). Une survie de 3 animaux sur 4 dans le groupe Test a été obtenue, ce qui valide l'effet protecteur de notre construction par rapport au groupe contrôle, résultats qui sont, par ailleurs, en complète adéquation avec la réponse humorale obtenue par la production d'anticorps neutralisants contre la FVR détectés par SNT. Malheureusement l'évaluation de la réponse cellulaire ne nous a pas permis de conclure quant à cette seconde expérimentation. La première expérimentation nous a permis de conclure à une lymphoprolifération des lymphocytes TCD4+ et CD8+ en réponse à une stimulation antigénique spécifique de la FVR. De gros problèmes techniques rencontrés lors de la seconde expérimentation ne nous ont pas permis de conclure quant à la réponse cellulaire induite. En conclusion, grâce à la collaboration établie avec l'Institut Pasteur et plus particulièrement les Dr Michèle Bouloy et Dr J.J. Panthier, le modèle murin MBT/Pas, le schéma d'immunisation proposé et le protocole utilisé pour l'épreuve infectieuse nous ont permis d'évaluer dans des conditions expérimentales optimales nos constructions vaccinales.

## 2. Immunisation de chèvres avec la construction vaccinale simple recombinant NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> du virus FVR

### 1.2. Matériel et méthodes

#### 1.1.1. Modèle d'étude

Afin d'évaluer la cinétique de séroconversion et la dynamique des réponses cellulaires observés après immunisation avec notre construction candidate capripoxvirus simple recombinant NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> pour la FVR, des expérimentations chez la chèvre ont été réalisées. La figure 69 présente le calendrier expérimental.



**Figure 69 :** Calendrier expérimental de l'essai capripoxvirus simple recombinant FVR chez la chèvre

Dix chèvres (*Capra aegagrus f. hircus*) de race Saanen hébergées en animalerie confinement 2 (CIRAD, Montpellier) (figure 70) ont été réparties en deux lots :

- **Un groupe témoin** composé de 5 chèvres (4038, 5007, 7048, 70003, 70006), a été inoculé par voie sous cutanée avec une dose de  $10^{5.9}$  DICT<sub>50</sub> à J0 et J21 avec la construction vaccinale capripoxvirus-H-PPR, le gène H exprimé correspond au gène codant pour l'hémagglutinine du virus de la peste des petits ruminants. Cette construction, considérée comme irrelevante dans notre essai a déjà été montrée comme protectrice contre une épreuve infectieuse PPR (Diallo *et al.*, 2002 ; Berhé *et al.*, 2003).
- **Le deuxième groupe, le groupe test** est composé de 5 chèvres (3038, 60024, 70002, 70005, 70007) immunisées par voie sous cutané avec une dose de  $10^{5.9}$  DICT<sub>50</sub> à J0 et J21 avec la construction candidate vaccinale NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> du virus FVR. Cette construction est considérée comme la construction candidate protégeant contre la FVR et comportant le gène G<sub>N</sub> contenant les épitopes neutralisants.



**Figure 70** : Les chèvres de l'expérimentation

Les chèvres ont fait l'objet d'un prélèvement de sang sur tubes secs, une fois par semaine dès le jour de l'immunisation (J0). Les tubes secs sont mis à décanter à +4°C, puis le sérum est récolté, aliquoté et stocké à -20°C pour recherche d'anticorps.

Enfin, des prélèvements de sang sur tubes héparinés sont effectués hebdomadairement dès le jour de l'immunisation. Le sang est traité pour la récolte des cellules mononuclées qui sont restimulées pendant 4 jours avec du virus entier inactivé (KS-1 et FVR). Les cellules et le surnageant de culture sont prélevés à 4 jours puis stockés à -80°C pour recherche ultérieure de cytokines.

### 1.1.2. Méthodes

#### *1.1.2.1. Evaluation de la réponse immunitaire de type humorale*

La présence d'anticorps neutralisants anti-FVR dans les sérums prélevés en cinétique est testée par la technique de neutralisation virale, la présence d'anticorps anti- H-PPR par ELISA de compétition et neutralisation virale, et la présence d'anticorps anti-Cpox par immunofluorescence.

#### **A - Recherche d'anticorps anti-FVR par neutralisation virale**

Les sérums caprins sont dilués en duplicate, du  $1/10^{\text{ème}}$  jusqu'au  $1/640^{\text{ème}}$ , dans un volume de 100  $\mu\text{l}$  en milieu MEM (Gibco) sans sérum puis sont mis en contact avec 100 TCID<sub>50</sub> de virus FVR souche Smithburn Gp39, 1974 (contenu dans 100  $\mu\text{l}$ ) en plaques 96 puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C, un nombre total de  $2 \times 10^5$  cellules VERO (contenues dans 50  $\mu\text{l}$ ) sont ajoutées dans chaque puits et les plaques sont incubées à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 5 à 10 jours. Les résultats obtenus sont exprimés en titre viral et correspondent à l'inverse de la dilution la plus haute donnant 50 % d'ECP. Les sérums avec des titres supérieurs à 10 sont considérés comme positifs. Une plaque contrôle réalisée à chaque série d'essais permet de valider la dose virale de 100 TCID<sub>50</sub> de virus FVR ajoutées dans chacun des puits.

#### **B - Recherche d'anticorps anti-HPPR par ELISA de compétition et neutralisation virale**

- ELISA de compétition : la présence d'anticorps anti-HPPR est mesurée par un ELISA de compétition suivant la technique décrite par Anderson *et al.*, 1991.
- Neutralisation virale : Chacun des sérums est dilué en double, du  $1/10^{\text{ème}}$  jusqu'au  $1/640^{\text{ème}}$ , puis sont mis en contact avec 100 TCID<sub>50</sub> de virus PPR souche vaccinale Nigeria 75/1 en plaques 96 puits (contenu dans 100  $\mu\text{l}$ ). Après 1 heure d'incubation à 37°C, un nombre total de  $2 \times 10^5$  cellules VERO (contenues dans 50  $\mu\text{l}$ ) sont ajoutées dans chaque puits et les plaques sont incubées à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 5 à 10 jours. Les résultats obtenus sont exprimés en titre viral et correspondent à l'inverse de la dilution la plus haute donnant 50 % d'ECP. Les sérums avec des titres supérieurs à 10 sont considérés comme positifs. Une plaque contrôle réalisée à chaque série d'essais permet de valider la dose virale de 100 TCID<sub>50</sub> de virus PPR ajoutées dans chacun des puits.

#### **C - Recherche d'anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence**

Des plaques de culture 96 puits (Nunc) sont préparées à raison de  $2.5 \times 10^4$  cellules OA3Ts en milieu DMEM avec 10% de SBF par puits. Le jour suivant, les cellules à confluence, sont infectées avec le KS-1 avec une dose de 100 TCID<sub>50</sub>/ml. Le virus est laissé en contact avec

les cellules pendant 2 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> puis du milieu de culture complet est ajouté. Après 48h d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont fixées pendant 30 minutes à -20°C en acétone 80%.

Les cellules sont perméabilisées 30 minutes avec du Triton 100X à 0,2% puis incubées 20 minutes à 37°C avec un tampon de blocage (PBS1X, gélatine 0,2%). Les sérums caprins et ovins sont ajoutés en double à une dilution au 1/50<sup>ème</sup> (dans du tampon de blocage), pendant 30 minutes à 37°C. Après trois rinçages avec du tampon de blocage des anticorps anti-chèvre-FITC ou anti-mouton-FITC (F0250 et F0135, respectivement - Dako, USA) sont ajoutés au 1/50<sup>ème</sup> dans du tampon de blocage. Après trois rinçages en PBS, l'observation de la fluorescence est effectuée au microscope (Nikon, eclipse TE300). Des cellules non infectées servent de témoins négatifs.

#### *1.1.2.2. Analyse de la réponse immunitaire de type cellulaire*

De même que pour les expérimentations dans le modèle souris, la réponse immunitaire de type cellulaire a été évaluée au travers de deux aspects :

- l'estimation de la prolifération et le typage des sous populations lymphocytaires après restimulation avec le virus entier inactivé souche FVR Smithburn, group 39, 1974.
- le dosage de cytokines au niveau ARN à partir des culots cellulaires restimulés *in vitro*.

Pour se faire, les cellules mononuclées (PBMCs ou Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolées à partir du sang périphérique, dilué au 1/3, sur milieu de séparation des lymphocytes (Histopaque 1083, SIGMA, USA). Une partie des cellules blanches est placée directement en restimulation avec les préparations antigéniques composé de virus entier inactivé aux UV pendant 30 minutes à température ambiante (Crosslinker UV), KS-1 et FVR à raison d'une MOI de 1 et 5 respectivement, dans du milieu RPMI (Sigma, USA) enrichi à 10% SBF, 1% L-glu et 1% Antimycotiques-Antibiotiques (Cat 15240, Gibco, USA). L'autre partie des cellules blanches est d'abord marquée avec un traceur cellulaire, le CFSE (CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester – Molecular Probes, USA) afin de suivre la prolifération cellulaire puis mise en restimulation avec les mêmes préparations antigéniques composé de virus entier inactivé aux UV pendant 30 minutes à température ambiante (Crosslinker UV), KS-1 et FVR à raison d'une MOI de 1 et 5 respectivement. Les contrôles négatifs et positifs sont soit du milieu de culture seul, soit du milieu de culture contenant un

mitogène, la concanavaline A à 5 ug/ml (ConA, Sigma, USA). Les cellules sont incubées 4 jours en présence ou non des préparations antigéniques de restimulation. Une partie des culots cellulaires ( $2 \times 10^6$  cellules) sont récoltés et placés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour stockage pour extraction ARN et RT-QPCR pour la quantification des cytokines au niveau ARNm.

#### Estimation de la prolifération et le typage des sous populations lymphocytaires :

L'activation et la prolifération des cellules sont évaluées par passage au cytomètre en flux (FACSsort, Becton Dickinson) en utilisant les paramètres FSC x SSC, FL1 x FSC, FL1 x FL2. Tous les lymphocytes quiescents présentent une apparence uniforme de cellules rondes de petite taille avec un noyau dense et peu de cytoplasme. Les lymphocytes activés se multiplient rapidement et forment des structures appelées blastes. Afin de phénotyper et quantifier les sous-populations fonctionnelles (lymphocytes T CD4, lymphocytes T CD8), des marquages spécifiques sont effectués (tableau 18).

Les anticorps marqués Phycoerytherin (PE) (marquant les CD4, CD8 ou témoin négatif isotype control) dilués de façon appropriée, sont incubés avec les cellules pendant 20 minutes à  $+4^{\circ}\text{C}$ . Le témoin négatif isotype control permet d'évaluer le bruit de fonds lié à une éventuelle autoprofération des cellules. Les cellules sont lavées et analysées au cytomètre en flux à l'aide du logiciel CellQuest 3.01. Les informations apportées par la cytométrie en flux concernent la taille (Forward Scatter – FSC), la granularité (Side Scatter – SSC) et l'intensité de fluorescence émise par la cellule (FL-1, FL-2 dans notre cas). Après 10 000 évènements, on obtient un nuage de points, ou dot plot, représentatif des populations cellulaires acquises. L'analyse de ces populations cellulaires pourra se faire en fonction des caractéristiques physiques des cellules (FSC / SSC) ou de la fluorescence émise (FSC / FL-1 ou FL-2 pour un simple marquage; FL-1/ FL-2 pour un double-marquage). Les valeurs représentées dans les figures correspondent aux valeurs de prolifération des puits témoin (cellules seules sans stimulation avec milieu de culture RPMI) retranchées aux valeurs spécifiques obtenues avec chacun des antigènes. Les valeurs obtenues pour les groupes témoins et CpoX-FVR sont comparées par le test statistique de Mann-Whitney. Une valeur de probabilité  $p < 0.05$  est considéré comme significative.

Cellules cibles	Anticorps utilisés, dilution 1/200
Lymphocytes T CD4	Anti-CD4 PE (BD, Cat 553049)



Lymphocytes T CD8	Anti-CD8PE (BD, Cat 553033)
Isotype Control	IgG2a-PE (BD, Cat 553457)

**Tableau 18:** Liste des Anticorps utilisés pour le typage des populations lymphocytaires chez la chèvre

#### Dosage de cytokines au niveau ARN à partir des culots cellulaires restimulés *in vitro*

Les culots cellulaires sont récoltés après 4 jours de re-stimulation ont permis le dosage des cytokines de type Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et TNF). Les amorces Forward et Reverse ont été définies à partir des séquences de cytokines disponibles sur GenBank, et ont fait l'objet d'optimisation avec des variations de concentration de 150, 300 et 600 nM pour chacune des amorces, et des variations de T<sub>m</sub> (de 58°C à 62°C). Les séquences et les conditions optimales pour des raisons de confidentialité ne seront pas décrites dans ce manuscrit.

L'ARN est extrait à partir du sang selon le kit *RNeasy*® Mini Kit (Macherey Nagel) à partir de  $2 \times 10^6$  cellules conservées à - 80°C et reprises dans 150 µl de PBS, selon les instructions du fournisseur avec une élution dans 80 µl d'eau. Les ARN sont quantifiés au spectrophotomètre à une Do 260 nm, en tenant compte du ratio 260/280 nm. Les ADNc sont synthétisés à partir des ARN à l'aide du kit « first-strand cDNA synthesis » (Amersham Biosciences, UK) selon les instructions du fournisseur. Une quantité de 400 ng d'ARN est synthétisée pour un volume finale de 15 µl, comprenant 1 µl de pdN<sub>6</sub>, 1 µl de DTT et 5 µl de bulk first strand, les 8 µl restant étant composé d'eau et de 400 ng d'ARN. Les réactions de PCR se font dans un volume final de 25 µl réparti de la manière suivante: 12,5 µl de Tampon 2X Brilliant II SybrGreen QPCR Master Mix (Agilent, USA), 3 µl d'un mélange amorces (F et R) aux concentrations optimales décrites dans le tableau 18Bis, 8 µl d'eau et 1.5 µl (soit 15 ng si on considère que tous les ARN ont été transcrits en cDNA) sous les conditions suivantes avec l'appareil Mx3000 (Stratagene, Agilent (USA) en lecture FAM, SybrGreen : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes suivie par 40 cycles [95°C, 30 sec ; 60°C ou 62°C en fonction des cytokines, 1 min ; 72°C, 1 min]. Un contrôle NTC (Non Template Control) est ajouté à chaque réaction de RT-PCR afin d'exclure toute contamination. Les résultats sont exprimées en valeur de Ct. Le gène constitutif qui nous permet de normaliser

nos amplifications est le gène ARN 18S. Les valeurs finales pour chacune des cytokines sont donc exprimées en  $\Delta \Delta C_t$  par rapport à la valeur obtenue pour l'amplification de l'ARN 18S.

La formule suivante a été utilisée :

$2^{\Delta \Delta C_t} = [E^{-(C_{tTO} \text{ gene} - C_{tT1} \text{ gene})} / E^{-(C_{tTO} \text{ ARN18S} - C_{tT1} \text{ ARN18S})}]$ , T0 et T1 étant les conditions qui doivent être comparées, dans notre cas cellules en stimulation antigénique spécifique versus cellules en milieu de culture seul, E étant l'efficacité de la réaction de QPCR évaluée sur une gamme standard. LE résultat est un foldchange. Si =1 pas de différence, Si >1 alors T0>T1 et si <1, alors T0<T1. Un fold change < ou >2 est considéré comme significatif.

Cytokines	Taille de l'amplicon	Conditions QPCR
IL-4	130 bp	300 nM F/ 150 nM R Tm de 62°C
IL-10	235 bp	300 nM F/ 300 nM R Tm de 60°C
IL-12p40	237 bp	300 nM F/ 600 nM R Tm de 60°C
IFN- $\gamma$	202 bp	300 nM F/ 600 nM R Tm de 60°C
ARN 18S	232 bp	300 nM F/ 300 nM R Tm de 60 et 62°C

**Tableau 18bis:** Liste des conditions utilisées pour la quantification par RT-QPCR SybrGreen

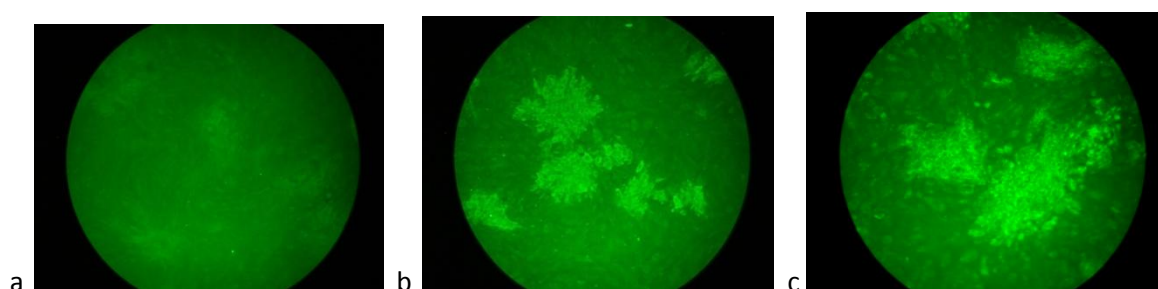
## **1.2. Résultats**

### **1.2.1. Evaluation de la réponse humorale**

Afin d'évaluer la cinétique de séroconversion des chèvres après immunisation avec la construction vaccinale simple recombinant NSmGN, les sérums des animaux des 2 groupes ont été prélevés toutes les semaines (cf figure 71) et le suivi sérologique assuré.

#### **1-2-1-1 - Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence**

Les anticorps anti-capripoxvirus sont révélés par immunofluorescence (IF). La figure 71 présente un exemple des résultats de l'IF obtenus sur les différents sérums testés. **a.** pour les chèvres du groupe Capripox-H-PPR (immunisées avec un vaccin sans rapport avec le vaccin testé, le capripoxvirus-HPPR), **b.** pour les chèvres du groupe Capripox-NSmG<sub>N</sub> FVR (immunisées avec le capripoxvirus simple recombinant NSmG<sub>N</sub> FVR), **c.** est le témoin positif correspondant à un sérum hyper immun. Dès J14, soit deux semaines après l'immunisation, certaines chèvres des deux groupes présentent des anticorps anti-capripoxvirus détectables par IF. A J35 et J56, deux des 5 chèvres du groupe Cpox témoin (Cpox-HPPR), les chèvres identifiées sous les numéros 7048 et 70003 ne présentent aucune séroconversion, comme illustré dans le tableau 19.



**Figure 71** - Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence dans les sérums caprins au cours des essais expérimentaux *in vivo* chez la chèvre. **a.** Chèvres du groupe témoin irrelevant *Cpox-HPPR*, **b.** Chèvres du groupe *Test Cpox-NSmG<sub>N</sub> FVR* **c.** Témoin positif (sérum hyper immun).

#### 1-2-1-2 - Détection des anticorps anti- PPR par ELISA de compétition et SNT

Les anticorps dirigés contre la PPR sont détectés par 2 techniques bien différentes H-PPR, un ELISA de compétition permettant de mettre en évidence les anticorps dirigés contre la protéine H, utilisant donc des anticorps monoclonaux anti-H et la technique de séroneutralisation permettant de mettre en évidence des anticorps neutralisants.

Groupes	Identification	J0	J14	J35	J56
Cpox-PPR	4038	-	+	+	+
	5007	-	-	+	+
	7048	-	-	-	-
	70003	-	-	-	-
	70006	-	+	+	+
Cpox-FVR	3038	-	+	+	+
	60024	-	-	+	+

	70002	-	+	+	+
	70005	-	+	+	+
	70007	-	+	+	+

**Tableau 19** : Résultats qualitatifs des IF menées en cinétique sur les sérums des 2 groupes de chèvre testés

### ***ELISA de compétition anti-HPPR***

Le tableau 20 présente les résultats de pourcentage d'inhibition obtenus en ELISA de compétition spécifique de H-PPR de chacune des chèvres testées à J0, J14, J35 et J56. Les valeurs supérieures à un PI de 50 sont considérées comme positives (case rosée du tableau), celles en dessous de 50 comme négatives (case blanche du tableau). Une zone douteuse est toutefois établie entre 45 et 55 (case grisée dans le tableau).

Dès J14, quatre des cinq chèvres du groupe témoin ayant reçu le Cpox-HPPR présentent une séroconversion, à J35, la totalité des chèvres de ce groupe ont séroconverti, ce qui est attendu. En revanche, au point J0, la chèvre 70003 répond de façon positive, il s'est en fait avéré que les chèvres 70002 et 70003 de cet essai avaient fait l'objet d'un précédent essai de vaccination avec la souche vaccinale de PPR Nigeria 75/1, il est donc normal que ces 2 chèvres soient séropositives pour la PPR dès le J0 de notre essai. Pour les chèvres du groupe test ayant reçu du Cpox-NSmG<sub>N</sub> FVR, que ce soit à J0, J14, J35 ou J56, aucune des chèvres ne répond excepté la chèvre identifiée 70002, qui a déjà fait l'objet d'un premier essai expérimental de vaccination avec la souche vaccinale PPR 75/1, ce qui est donc explicable.

Groupes	Identification	J0	J14	J35	J56
<b>Cpox-PPR</b>	4038	14	56	79	72
	5007	4	46	73	54
	7048	22	27	72	66
	70003	78	79	78	78
	70006	19	63	77	79
<b>Cpox-FVR</b>	3038	13	17	25	10
	60024	26	17	16	16
	70002	77	78	77	74
	70005	19	18	25	26
	70007	-4	8	8	6

**Tableau 20** : Résultats quantitatifs des ELISA de compétition H exprimés en Pourcentage d'inhibition. Les valeurs <50 sont considérées comme négatives, celles >50 sont positives.

### ***Technique de séroneutralisation***

Le tableau 21 présente les titres obtenus en anticorps neutralisants en PPR de chacune des chèvres testées toutes les semaines de J0 à J70. Un titre > 15 est considéré comme positif. Les résultats obtenus corroborent avec ceux obtenus avec l'ELISA-H de compétition. Les chèvres 70002 et 70003 ont des titres en anticorps neutralisants la PPR dès J0 qui varie entre 30 et 60 tout au long de la cinétique. Dès J14, des titres en anticorps neutralisants sont observés de façon significative chez les cinq chèvres du groupe témoin ayant reçu le Cpox-HPPR, ces titres sont maintenus tout au long de l'expérimentation de J14 à J70. Pour le

groupe Test ayant reçu la construction vaccinale Cpox-NSmG<sub>N</sub> FVR, 3 des 5 animaux ne présentent aucun titre PPR, la chèvre identifiée 60024 donne des titres en limite de positivité aux points J14, J56 et J70. La chèvre 70002 présente des titres neutralisants correspondant à une vaccination de 2009 par la souche vaccinale PPR 75/1. Les titres viraux obtenus pour le groupe témoin CPox-PPR sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour le groupe Cpox-NSmG<sub>N</sub> FVR à tous les points de J14 et J70 (test Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

Groupes	Identification	J0	J14	J21	J28	J56	J70
Cpox-PPR	4038	<7,5	60	30	15	30	25
	5007	15	60	60	60	30	60
	7048	<7,5	25	30	60	25	30
	70003	60	50	10	60	60	20
	70006	15	60	30	50	60	25
Cpox-RIFT	3038	12,5	12,5	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5
	60024	<7,5	30	15	15	30	25
	70002	30	30	30	30	25	30
	70005	<7,5	15	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5
	70007	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5

**Tableau 21** : Titres viraux en PPR, obtenus par neutralisation virale lors de l'essai expérimental chez les chèvres. Les valeurs > 15 sont considérées comme positives.

### 1-2-1-3 - Détection des anticorps anti-FVR par SNT

Les anticorps anti-FVR sont détectés par un test de neutralisation virale. Le tableau 22 présente les titres obtenus en anticorps neutralisants en FVR de chacune des chèvres testées toutes les semaines de J0 à J70. Un Titre >10 est considéré comme positif.

Groupes	Identifiants	J0	J14	J21	J28	J35	J41	J49	J56	J70
Cpox-PPR	4038	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5007	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7048	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	70003	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	70006	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cpox-RIFT	3038	-	-	-	25	40	25	30	30	15
	60024	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	70002	-	-	-	30	30	50	30	30	25
	70005	-	-	-	60	30	20	25	20	25
	70007	-	-	-	60	60	25	30	20	15

**Tableau 22** - Titres viraux obtenus en FVR par neutralisation virale chez les chèvres immunisées par le capripoxvirus Cpox-NSmG<sub>N</sub> recombinant FVR (Groupe Test) et le capripoxvirus Cpox-H-PPR (Groupe Témoin). Un Titre >10 est considéré comme positif

Pour 4 animaux sur 5 du groupe Cpox-NSmG<sub>N</sub>-FVR, des anticorps anti-FVR sont détectés dès J28 ce qui correspond à une semaine après la seconde immunisation (J21). Les titres viraux obtenus pour le groupe CPox-FVR sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour le groupe témoin à tous les points de J28 à J70 (test Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Aucune séroconversion n'a été détectée pour les chèvres du groupe Témoin à aucun des points testés.

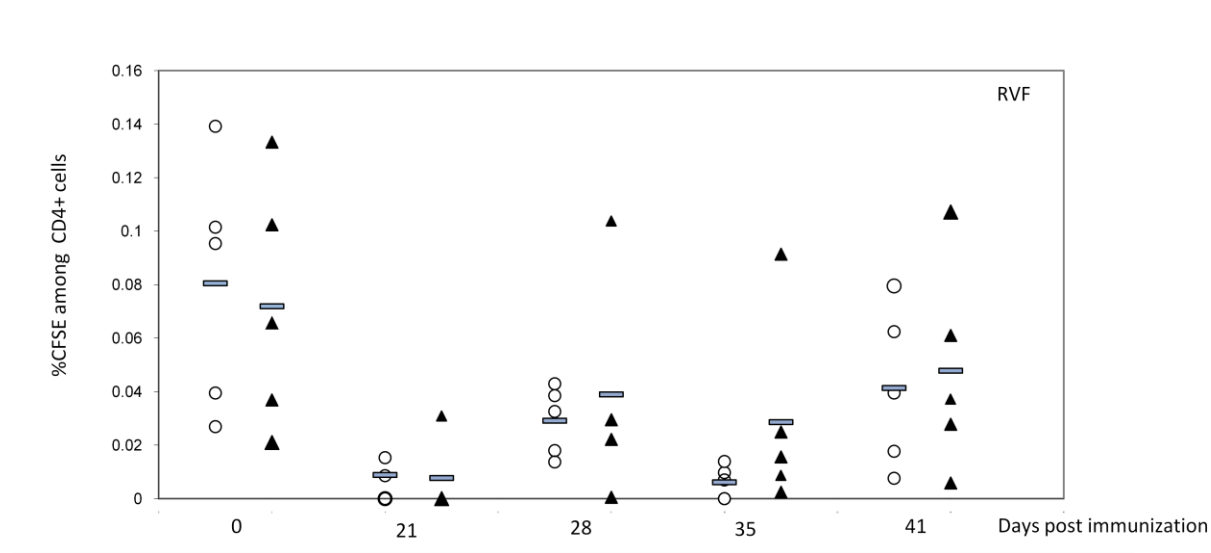
**En conclusion**, lors de l'essai expérimental conduit chez la chèvre, essai visant à évaluer l'immunogénicité induite par la construction vaccinale du simple recombinant FVR, l'induction de la réponse humorale a bien eu lieu. En effet, la détection d'anticorps dirigés contre la PPR (dans le groupe Témoin) ou contre la FVR (Groupe Test) est effective que ce soit par la technique de SNT (PPR, FVR, Cpox) qu'ELISA (PPR). Il reste surprenant que les chèvres 7048 et 70003 ne donnent pas de signal de séroconversion pour le capripoxvirus, alors que ces 2 mêmes chèvres répondent correctement en séroconversion PPR, évaluée par ELISA et SNT.

## **1.2.2. Evaluation de la réponse cellulaire par lymphoprolifération**

### 1-2-2-1 Etude de la lymphoprolifération

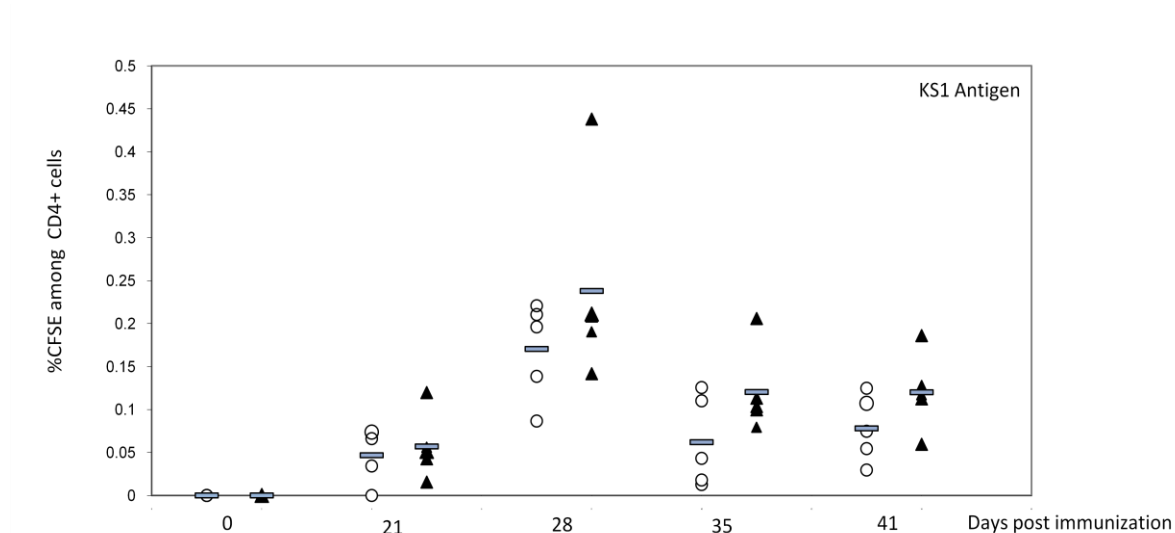
La prolifération des lymphocytes restimulés avec les préparations virales inactivées aux UVs est évaluée après marquage au CFSE et passage au cytomètre en flux. La figure 72 présente

les résultats de prolifération observés après restimulation avec le virus FVR. A J35, Une tendance de prolifération spécifique du virus FVR se dégage entre le groupe CpoX HPPR et le groupe CpoX-NSmG<sub>N</sub> FVR, cette différence n'est pourtant pas significative par le test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Aucune différence nette ne semble être observée au cours de la cinétique (J21, J28 et J41). Il est à noter que lors de ces expériences de restimulation in vitro, bien souvent une autoprofération cellulaire est observée surtout dans notre cas puisque nous utilisons des chèvres « outbred ». Les tests statistiques ne nous permettent alors que rarement d'obtenir une significativité.



**Figure 72 :** Prolifération des lymphocytes après restimulation avec les préparations antigéniques de virus FVR. Les cercles ronds vides représentent les 5 chèvres du groupe Témoin CpoX-HPPR, les triangles noirs les 5 chèvres du groupe CpoX-NSmG<sub>N</sub> FVR. Les barres horizontales représentent les moyennes de chaque groupe

La figure 73 présente les résultats de prolifération observée après restimulation avec le capripoxvirus KS-1. Les 2 groupes d'animaux ont été immunisés avec du Capripoxvirus, le groupe témoin avec du Capripox HPPR et le groupe Test avec du capripox CpoX-NSmG<sub>N</sub> FVR. Aucune différence nette ne semble être observée à J21 et J28 (présence d'une valeur de chèvre qui tend la moyenne vers le haut à ce point). En revanche, une légère tendance à l'augmentation semble apparaître à J35 et J41 en faveur du groupe test CpoX-NSmG<sub>N</sub> FVR, ce qui n'est pas attendu. Le nombre de doses administrées est identique, la construction CpoX-NSmG<sub>N</sub> FVR semble induire plus de prolifération spécifique du capripoxvirus.



**Figure 73:** Prolifération des lymphocytes après restimulation avec les préparations antigéniques de virus KS-1. Les cercles ronds vides représentent les 5 chèvres du groupe Témoin CpoX-HPPR, les triangles noirs les 5 chèvres du groupe CpoX-NSmGN FVR. Les barres horizontales représentent les moyennes de chaque groupe.

#### 1-2-2-2 Evaluation des réponses cytokines

Les premiers résultats obtenus en PCR quantitative pour les jours J35 et J41 post primo immunisation à partir des PBMCs restimulés in vitro avec les préparations virales spécifiques KS1 et FVR Smithburn sont encourageants mais ne seront pas présentés dans ce manuscrit, la répétition des expériences devant être réalisées avant interprétation définitive des résultats.

### 1.3. Conclusion

**En conclusion,** lors de l'essai expérimental conduit chez la chèvre, essai visant à évaluer l'immunogénicité induite par la construction vaccinale du simple recombinant FVR, l'induction de la réponse humorale a bien eu lieu, prouvé par la présence d'anticorps dirigés contre la PPR (dans le groupe Témoin) ou contre la FVR (Groupe Test). Toutes les chèvres ont également séroconverti vis-à-vis du capripoxvirus. Les 2 chèvres 7048 et 70003 que ne donnent cependant aucun signal positif de séroconversion pour le capripoxvirus, alors que ces 2 mêmes chèvres répondent correctement en séroconversion PPR, évaluée par ELISA et SNT. En ce qui concerne la réponse cellulaire obtenue après restimulation des PBMCs par des préparations antigéniques spécifiques KS1 et FVR, à J35, une tendance nette de prolifération spécifique du virus FVR se dégage entre le groupe CpoX HPPR et le groupe CpoX-NSmGN FVR, même si cette différence n'est pas significative par le test de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Egalement, une légère tendance de prolifération spécifique du virus KS1 semble apparaître à J35 et J41 en faveur du groupe test CpoX-NSmGN FVR alors que le nombre de doses de Capripoxvirus –FVR ou Capripoxvirus –PPR administrées est identique. La présence d'une forte autoprofération cellulaire chez les chèvres est vraisemblablement à l'origine de la non significativité des tests.



## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## DISCUSSION

Malgré les progrès et les avancées techniques récentes atteintes en vaccinologie, combiner à la fois multivalence, efficacité et innocuité pour les vaccins vectorisés reste toujours un enjeu de taille. La famille des *Poxviridae* et notamment la sous-famille des *Chordopoxvirinae* comprend des virus avec un cycle répliatif cytoplasmique, un génome ayant une capacité à intégrer de grands fragments d'ADN étranger et à générer une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire qui en font des vecteurs prometteurs pour le développement de stratégies de vaccination dites de « nouvelle génération ». Les exemples de leur application sont multiples et la liste ne cesse de s'élargir. Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte, il concerne l'utilisation d'une souche de capripoxvirus, la souche Kenya Sheeppox 1 (KS1) comme vecteur vaccinal répliatif permettant de protéger les ruminants par l'expression de plusieurs gènes spécifiques des virus de la fièvre de la Vallée du Rift et de la Peste des Petits Ruminants. Ce capripoxvirus uniquement répliatif chez les ruminants a été testé avec succès chez d'autres espèces animales telles que les lapins et souris pour l'expression entre autres de la glycoprotéine du virus de la rage (Aspden *et al.*, 2003). L'objectif principal de mon travail a consisté à concevoir un vecteur vaccinal à double valence dans deux sites d'insertion différents afin d'élaborer un moyen de contrôle efficace contre trois pathologies virales touchant les ruminants, les capripoxviroses, la Peste des Petits Ruminants et la fièvre de la Vallée du Rift.

L'Afrique du Nord est en situation d'endémie par rapport aux maladies virales contagieuses provoquées par des virus appartenant au genre *Capripoxvirus* et affectant principalement les ovins, caprins et bovins : il s'agit des virus de la clavelée du mouton, de la variole caprine et de la dermatose nodulaire contagieuse. Cette situation n'évolue pas malgré des programmes annuels de vaccination qui cependant n'ont jamais atteint les 100% du cheptel à vacciner. Les facteurs limitant sont multiples, entre autres :

- liés au terrain et à son inaccessibilité dans certaines régions qui rend difficile voire impossible la vaccination des espèces cibles
- les conduites d'élevages telles que la transhumance et le nomadisme qui sont spécifiques dans certaines parties du pays et constituent le frein majeur de l'application de ces programmes de lutte.

L'ensemble de ces conditions est en faveur de la persistance des infections, ainsi le statut épidémiologique du pays et des pays voisins vis à vis de ces capripoxviroses ne peut s'améliorer.

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie virale à transmission directe distribuée de façon spécifique en Afrique subsaharienne et sur le continent asiatique. Elle a récemment touché en 2008, le Maroc, et en 2011 l'Algérie créant ainsi chez ces 2 pays voisins du Maghreb une forte menace épidémique (OIE, 2011). Cette maladie est due à un virus appartenant au genre *Morbillivirus* et à la famille des *Paramyxoviridae*, elle est très contagieuse et entraîne une mortalité de 80% chez les jeunes et une morbidité de 100% chez les adultes. Son tableau clinique varié est difficile à différencier de celui de la variole ovine et caprine, de l'ecthyma contagieux et de bien d'autres infections. L'apparition de la PPR pour la première fois au Maroc constitue une alerte certaine pour les pays du Maghreb et au-delà l'Europe. Cet événement concrétise le risque d'émergence septentrionale de maladies présentes de façon épidémique ou endémique dans les pays d'Afrique subsaharienne.

La fièvre de la Vallée de Rift (FVR) est un autre exemple de maladie infectieuse, contagieuse, virulente, inoculable, mais également à transmission vectorielle. Elle frappe les ruminants domestiques et sauvages ainsi que l'homme. Elle est due à un arbovirus appartenant à la famille des *Bunyaviridae* et au genre *Phlébovirus*. Depuis sa première description par Daubney *et al.* (1931) au Kenya, le virus n'a cessé de se propager dans différents pays du continent africain à l'exception du Nord de l'Afrique et notamment des pays du Maghreb. Jusqu'en 1975, la FVR est considérée comme une maladie africaine, d'importance essentiellement vétérinaire provoquant des épizooties principalement chez les ovins en Afrique Orientale et Australe. L'homme n'était qu'un hôte accidentel et les cas humains rarement mortels. L'épizootie-épidémie de 1977 en Egypte constitue un véritable tournant dans l'histoire de la maladie puisqu'elle a provoqué plus de 600 cas humains mortels (Meegan, 1979). L'ampleur de ces épidémies de FVR touche principalement l'Afrique de l'Est, notamment le Kenya, l'Afrique du Sud, le Zimbabwe, Somalie, Tanzanie, Soudan. Lors de l'épidémie de 1997-1998, le virus s'est propagé vers le Yémen et l'Arabie Saoudite qui, en 2000, subirent un grave épisode épizootique et épidémique avec une mortalité humaine, pour la première fois en dehors du continent africain.

Les trois maladies précédemment décrites sont des maladies réputées contagieuses en France (MRC) et à déclaration obligatoire pour l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE).

Dans le but d'établir la situation épidémiologique en Tunisie vis-à-vis de la FVR et de la PPR, et ainsi estimer l'intérêt que pourrait avoir un vaccin trivalent, une enquête sérologique permettant d'évaluer les niveaux de séroprévalence pour ces 2 maladies a été réalisée en Tunisie en 2006-2007. Ces travaux sont présentés dans la première partie des résultats de ce manuscrit (partie II).

### **Enquête sérologique sur la PPR et la FVR en Tunisie**

Cette enquête transversale, pour la première fois à l'échelle nationale, s'est déroulée sur une période de 5 mois allant de septembre 2006 à janvier 2007 avec un échantillonnage ciblé sur six régions bien différentes en termes d'écologie. Ces régions sont toutes des zones à risque, pour certaines marécageuses (Bizerte, Sousse, Nabeul), comportant des gîtes pour les vecteurs potentiels et avérés de la FVR identifiés par des travaux antérieurs de l'équipe de parasitologie de l'Institut Pasteur de Tunis (Moutailler *et al.*, 2008). Les régions du centre de la Tunisie (Kairouan) et d'autres régions limitrophes (Kébili, Médenine) ont été également sélectionnées puisqu'elles sont des zones de rassemblement et de mouvement incontrôlés d'animaux avec les pays voisins. Au total, 610 sérums ont été collectés provenant de 263 ovins, 119 caprins, 193 bovins et 35 camélidés tous choisis aléatoirement. Seuls les sérums issus des petits ruminants ont été analysés en sérologie PPR par le test ELISA compétitif N-PPR (Libeau *et al.*, 1995). En revanche, tous les échantillons ont été testés en FVR avec un ELISA IgG compétitif (Paweska *et al.*, 2005). Dans le but de déceler d'éventuels souches circulantes de PPR, un total de 28 échantillons de poumons provenant d'animaux tués en abattoir ont été également testés par RT-PCR (Couacy-Hymann *et al.*, 2002). Une séroprévalence PPR de 7,6% (4,9-10,1) avec un intervalle de confiance de 95% a été détectée en Tunisie. Les régions de Kairouan et Kébili sont les plus touchées avec des séroconversions respectives de 15,6% (8,7-22,3) et 12,5% (3,1-20,9) avec le même intervalle de confiance de 95%. Ces résultats cohérents matérialisent la particularité de ces 2 régions où se concentre et circule la grande majorité des petits ruminants avec un contrôle de leur mouvement qui peut

souffrir de défaillances. Ces deux régions constituent une porte ouverte à l'introduction de diverses pathologies du bétail. Les travaux de Sow *et al.*, en 2008, portant sur une enquête sérologique au Burkina-Faso a aussi révélé des différences au niveau des séroprévalences entre différentes provinces . Bien que la PPR soit connue comme une pathologie spécifique des petits ruminants, le virus de la PPR touche plus les caprins que les ovins ce qui concorde avec les résultats que nous avons obtenus avec une différence statistiquement significative ( $p=0,04$ ) entre caprins (11,8%) et ovins (5,7%). Les résultats présentés par Sow *et al.*, 2008 étaient inversés, en effet la prévalence des ovins était de 33,09% alors que celle des caprins était de 23,1%. A l'instar de ces résultats, il apparaît comme étonnant que malgré un taux de séroprévalence PPR assez élevé, aucun foyer clinique n'ait été décelé en Tunisie. Plusieurs hypothèses sont à envisager :

- les symptômes de la PPR peuvent être confondus avec ceux d'autres infections qui sévissent déjà dans la région comme la fièvre catarrhale ovine, la variole ovine et caprine dans sa forme généralisée, ou bien encore l'ecthyma contagieux (Ozmen *et al.*, 2009). Ainsi, en l'absence de diagnostic différentiel, les foyers ont pu exister sans être identifiés.
- la race des animaux peut être également un facteur limitant dans l'évolution clinique de la maladie, ce qui nous conduit à supposer que certaines races locales ovines et caprines pourraient être résistantes à l'infection par le virus de la PPR. Ceci fut observé dans le cas de la FCO sur le territoire algérien.
- enfin, la taille de l'échantillon testé par PCR (28 poumons) ne permet pas d'aboutir à des conclusions sur l'absence de PPR sur l'ensemble du territoire tunisien, ainsi d'autres prélèvements doivent être effectués dans différents abattoirs à différentes périodes, ce qui permettra de mieux statuer sur la présence/absence de circulation du virus PPR.

Aucune séroconversion concernant le virus de la FVR n'a été détectée avec une taille d'échantillon permettant de déceler une séroprévalence d'au moins 1%. La sensibilité du test ELISA (99%-100%) permet de conforter largement ces résultats. D'autre part, la présence de vecteurs compétents dans la transmission du virus FVR est signalée dans la totalité des régions où a eu lieu l'échantillonnage (Moutailler *et al.*, 2008). Principalement les deux espèces de *Culex* impliquées dans la transmission du virus FVR dans les foyers éclatés en Egypte et en Afrique du Sud (Gear *et al.*, 1955 ; Hoogstraal *et al.*, 1979), *Culex pipiens* et

*Culex theileri* ont été identifiés en Tunisie dans les six régions à l'exception de Bizerte où seul *Culex pipiens* a été identifié.

Pour conclure, une circulation virale du virus PPR est confirmée en Tunisie, ce qui n'est pas le cas pour le virus FVR. Ces premiers résultats préliminaires amènent à proposer d'élargir le champ d'investigation et notamment développer une enquête à large échelle. Spécifiquement pour la PPR, des essais de reproduction expérimentale de la maladie doivent être envisagés pour étudier la pathogénie de l'infection sur les races locales en Tunisie. De même qu'une vigilance doit être de mise concernant tous les cas cliniques confondus avec ceux de la PPR, ce qui pourrait aboutir à l'isolement de souches virales.

Afin de répondre au principal objectif de ce travail, une stratégie de vaccins vectorisés a été engagée et le modèle du vecteur capripoxvirus et plus précisément celui du virus de la dermatose nodulaire contagieuse a été choisi. Ce virus a, par ailleurs, déjà fait ses preuves comme vaccin recombinant contre la PPR et la fièvre catarrhale ovine (FCO) respectivement (Diallo *et al.*, 2002; Berhé G. *et al.*, 2003 ; Perrin *et al.*, 2007)

## **Développement de vaccins capripoxvirus recombinants pour la FVR et la PPR**

### ***Choix des gènes d'intérêt à exprimer***

Le virus de la FVR comporte deux glycoprotéines structurales  $G_2/G_1$ , respectivement  $G_N$  et  $G_C$  impliquées essentiellement dans l'induction de la réponse immunitaire et dans la protection, ce qui a orienté notre choix (Schmaljohn *et al.*, 1989). Le segment M du génome viral code pour une polyprotéine précurseur qui selon le processus protéolytique post-translational donne lieu à 4 protéines matures dont  $G_N$  et  $G_C$ . Le rôle des deux autres protéines qui sont non structurales, NSm1 (78k-Da) et NSm2 (14k-Da) n'est pas bien défini. Ces 2 protéines ne sont impliquées ni dans le processus de réplication ni dans celui de la libération des particules infectieuses, mais elles auraient un rôle partiel dans l'apoptose cellulaire. Nos travaux se sont basés sur le segment M à partir duquel plusieurs amplifications ont eu lieu. Le segment M est constitué de 5 ATG à des positions différentes donnant lieu à plusieurs cadres de lecture possibles avec un rôle des différents ATG sur l'expression des 4 composants de la

polyprotéine (Suzich *et al.*, 1990). Ainsi, il a été démontré que le premier ATG n'est pas impliqué dans la synthèse de  $G_N$  et que sa délétion augmente l'expression de celle-ci et de 50% de celle de la glycoprotéine  $G_c$  (Suzich *et al.*, 1990). En se basant sur ces résultats, la séquence nucléotidique choisie pour nos constructions plasmidiques commence au second ATG. Deux types de fragments ont pu être générés pour la construction des cassettes d'expression : le fragment  $NSmG_NG_c$  (3600pb) et le fragment  $NSmG_N$  (2000pb). Bien que le 2ème fragment ne comporte pas la séquence du gène  $G_c$ , ce dernier est capable de conférer une réponse immunitaire protectrice puisque la séquence de  $G_N$  est connue pour comporter 3 épitopes dominants, cibles de la réponse immunitaire (Ikegami *et al.*, 2009). La glycoprotéine  $G_c$  joue un rôle dans l'induction de l'immunité en confortant celui de la protéine  $G_N$  (Ikegami *et al.*, 2009).

Pour la PPR, le gène de l'hémagglutinine a été choisi. L'hémagglutinine H est une glycoprotéine qui permet la fixation du virus PPR au récepteur de la cellule hôte. Elle est connue pour être la cible d'anticorps neutralisants *in vitro* et a été à l'origine du développement de tests de diagnostic (Barrett *et al.*, 1999). Des constructions vaccinales à base de vecteur capripoxvirus soit un simple recombinant H-PPR, soit un simple recombinant F-PPR ont mis en évidence le rôle protecteur de ces 2 protéines exprimées de façon individuelle vis-à-vis d'une infection virulente (Diallo *et al.*, 2002; Berhé *et al.*, 2003).

Des plasmides de transfert ou plasmide navette spécifiques des gènes FVR ont été construits pour aboutir à l'étape de recombinaison homologue avec le génome du capripoxvirus pour l'élaboration des vaccins simple ou double recombinants.

### ***Constructions plasmidiques et choix de la méthode de sélection***

Il s'agit au cours de cette étape de générer les différentes constructions plasmidiques permettant l'étape de recombinaison homologue avec le génome du capripoxvirus. Le choix des sites d'insertion dans le génome du capripoxvirus et des marqueurs de sélection des recombinants est un facteur clef de ces constructions. En ce qui concerne les sites d'insertion, le site de la thymidine kinase a été choisi et a déjà fait ses preuves dans le cas de nombreuses constructions. Le second site choisi est le gène spécifique d'un analogue du récepteur à l'interleukine 8 (Le Goff *et al.*, 2009), il a été testé et validé *in vivo* lors de récents essais

expérimentaux conduits au Cameroun avec des vaccins simple recombinants pour le virus H-PPR (Cêtre-Sossah, communication personnelle).

Quatre « cassettes » plasmides de transfert ont été générés, deux exprimant le gène NSmG<sub>N</sub>Gc soit sous sélection du gène *Ecogpt* soit sous sélection de la généticine (GNT) et deux autres exprimant le gène NSmG<sub>N</sub> soit sous sélection du gène *Ecogpt* soit sous sélection de la généticine (GNT). Après vérification de la fonctionnalité de ces plasmides de transfert par expression transitoire avec du virus KS1 sur les lignées cellulaires de testicules de moutons OA3Ts capables de répliquer les capripoxvirus, le séquençage complet de ces constructions a été réalisé. Cette étape de séquençage est une étape fondamentale dans l'élaboration des recombinants puisqu'elle peut révéler l'existence de mutations qui peuvent provoquer l'apparition par exemple de codons stop non désirés limitant ainsi fortement l'expression des protéines et donc les conditions favorables pour la recombinaison homologe. Dans le cas de quatre constructions plasmidiques, seule la construction pKSCATPSGPT-NSmG<sub>N</sub> noté également pKSCATPSGPT-NSmG<sub>2</sub> a été validée. Les étapes permettant d'aboutir aux 4 constructions sont reprises ci-dessous.

Le capripoxvirus simple recombinant pour la FVR a été obtenu à partir du plasmide pKSCATPSGPT-NSmG<sub>N</sub>. A titre de rappel, il a été obtenu par recombinaison au niveau du site d'insertion TK. Il constitue la première étape dans l'élaboration du double recombinant FVR-PPR. La sélection est basée sur le gène *Ecogpt*, partiellement efficace puisque le milieu sélectif utilisé ne permet pas une élimination totale et rapide du virus parental. Pour tenter d'améliorer ce processus de sélection GPT, nous avons fait varier la composition du milieu sélectif, notamment les concentrations en acide mycophénolique (MPA), hypoxanthine (HPX) et xanthine, composés qui sont les molécules actives de ce milieu sélectif. Différentes concentrations de sérum de fœtus de bovin (SBF) présent dans ce milieu ont été testées, de façon à limiter la multiplication du virus parental KS-1. Pour cela, deux compositions différentes ont été testées où à chaque fois, la mortalité cellulaire sur lignée OA3Ts et la cinétique de répllication/infection de la souche KS-1 sur les cellules ont été évalués. Ci-joint la composition des deux milieux sélectifs (MS), MS1 et MS2 considérés :



Composés	<b><i>MS1 (Source, Institute Animal Health Pirbright)</i></b>	<b><i>MS2 (Sources, Romero et al., 1993; Falkner et al., 1988)</i></b>
MPA	<b><i>125 µg/ml</i></b>	<b><i>25 µg/ml</i></b>
Xanthine	<b><i>250 µg/ml</i></b>	<b><i>250 µg/ml</i></b>
Hypoxanthine	<b><i>30 µg/ml</i></b>	<b><i>15 µg/ml</i></b>
SBF	<b><i>SBF 10%</i></b>	<b><i>SBF 2,5%</i></b>

Le premier milieu sélectif MS1 correspond au milieu utilisé en routine dans le laboratoire et qui a permis la génération des recombinauts capripoxvirus PPR et FCO. Le second milieu sélectif MS2 correspond à celui utilisé par Falkner lors des processus de sélection des virus recombinauts générés avec le virus de la vaccine (Falkner *et al.*, 1988). Finalement, en diminuant la pression de sélection (milieu selon Falkner *et al.*, 1988) et la concentration du SBF, la multiplication du virus parental KS-1 est diminuée ce qui laisse le temps au capripoxvirus recombinant de se multiplier. Cette composition a été la mieux adaptée à la production de nos recombinauts.

D'autres marqueurs de sélection existent tels que la résistance à la néomycine (Franke *et al.*, 1985) ou à la puromycine (Sanchez-Puig *et al.*, 2000), seulement les milieux sélectifs spécifiques comportant une certaine concentration de ces antibiotiques engendrent une forte mortalité cellulaire sur de nombreuses lignées. Récemment Hansen a développé une enzyme bi fonctionnelle (Bizyme) qui permettrait une sélection plus simple et plus rapide des virus recombinauts (Hansen *et al.*, 2002). Néanmoins, la résistance à l'acide mycophénolique MPA sélectionnant le gène *EcoGpt* reste une des méthodes les plus efficaces et les plus couramment utilisées (Berhé *et al.*, 2003; Falkner *et al.*, 1988; Romero *et al.*, 1993;1994). Une double sélection *EcoGPT* et GFP peut permettre dans certains cas une sélection et une purification plus rapide des recombinauts (Wallace *et al.*, 2005; Boone *et al.*, 2007). La technologie utilisée par Boone et al. utilisant un criblage des recombinauts non pas par PCR mais par la technique du Southern blot pourrait être appliquée à l'élaboration de nos recombinauts. Elle présente l'avantage de permettre la sélection des virus recombinauts par plages de lyse sans nécessité d'insérer un marqueur de sélection dans le génome viral.

Le capripoxvirus double recombinant pour la FVR et la PPR a été obtenu à partir du plasmide pKSCATPSGPT-NSmG<sub>N</sub>-HPPR. Il est le résultat d'une recombinaison homologue entre le plasmide pKSCATPSGPT-NSmG<sub>N</sub> avec site d'insertion TK et le génome du capripoxvirus recombinant Rec KSCATPSGPT-HPPR avec site d'insertion R-IL8 déjà disponible au laboratoire. Puisque dans ce cas, la cassette d'expression pKSCATPSGPT-NSmG<sub>N</sub>-FVR et le recombinant Rec KSCATPSGPT-HPPR comporte le même marqueur de sélection GPT, il nous a fallu envisager un autre moyen de sélection pour aboutir à la sélection et purification de ce double recombinant. Ce volet concernant le choix des marqueurs de sélection dans nos constructions a été une lourde contrainte au cours de notre travail de thèse. En effet, les seules cassettes d'expression qui ont été obtenues sans souci de fonctionnalité et de séquençage sont les cassettes avec le marqueur de sélection *Ecogpt*. La conception de nouvelles constructions plasmidiques avec d'autres marqueurs est toujours d'actualité. La meilleure stratégie pour nous était de coupler un système de sélection positif basé sur le gène de la green fluorescent protein (GFP) d'*Aequorea victoria*, une méduse bioluminescente (Dominguez *et al.*, 1998, Wallace *et al.*, 2007, avec un marqueur de sélection négatif basé sur un antibiotique par exemple (gène *Ecogpt*) sous forme de gène de fusion *Ecogpt-eGFP*. Le marqueur positif GFP permet une visualisation rapide, au microscope à fluorescence, des virus ayant intégré le gène GFP. Cela permettrait d'accélérer la récolte des virus recombinants dès qu'un ECP se développe avec une fluorescence visualisée au microscope. Faute de disponibilité de ce système de sélection *Ecogpt-eGFP* au laboratoire et de l'impossibilité de l'obtenir d'un laboratoire tiers, cette solution n'a pas pu être adoptée mais reste à l'ordre du jour. En revanche, une méthode de sélection à partir de billes revêtues de groupement chimique Carboxyl (Carboxyl Adembeads, Ademtech, France) a été testée pour purifier et isoler les virus recombinants. Ce système est basé sur une sélection par des billes magnétiques sur lesquelles un anticorps est fixé par une liaison covalente avec des groupements CO-NH. Il a été appliqué sur le virus de l'Hépatite C pour son étude en cryo-microscopie (Bounnafous *et al.*, 2010). Ces billes ont la particularité d'établir des liaisons covalentes au niveau de leur surface recouverte d'anticorps par exemple et le virus correspondant à partir d'un lysat ou d'une suspension cellulaire. Un certain nombre de mises au point a été nécessaire pour évaluer toutes les situations possibles en faisant varier aussi bien les concentrations des anticorps pour le marquage des billes que le volume de billes optimal pour le greffage viral. Les conditions idéales choisies (50 µg et 60 µl) ont été testées sur des suspensions virales contenant le virus FVR et le virus KS1 à différents titres (suspension virale FVR-Smithburn à

$10^3$  et  $10^5$  TCID<sub>50</sub> et mélange de FVR- *Smithburn* et *KS-1* avec une combinaison  $10^3/10^3$  et  $10^5/10^5$ ).

La première étape de cette démarche est de réaliser le greffage des billes avec un anticorps contre les antigènes du virus FVR qui permettra la récolte et purification des capripoxvirus simple et double recombinants portant la valence FVR. La seconde étape est de greffer un autre lot de billes par des anticorps anti-PPR qui aboutira à la sélection du double recombinant pKSCATPSGT-NSmG<sub>N</sub>GcFVR-HPPR. Les résultats obtenus au cours de la phase d'optimisation étaient encourageants. Ainsi, à partir d'un volume de billes de 60 µl marquées avec 50 µg d'anticorps monoclonaux anti-FVR, la totalité des particules virales de la souche FVR *Smithburn* et la totalité des particules virales issues du mélange *KS1/Smithburn* ont été fixées et récoltées par les billes. Faute de temps, ces investigations n'ont pas pu progresser et la première étape de tri sélectif des recombinants portant les valences FVR n'a pu être achevée. Face à cette situation, l'évaluation de l'effet protecteur et l'étude de la réponse immunitaire n'a été conduite que sur le simple recombinant FVR, le pKSCATPSGPT-NSmG<sub>N</sub>FVR.

### ***Validation du système vaccinal capripoxvirus FVR***

Les recombinaisons homologues ont permis d'aboutir à l'élaboration de treize clones capripoxvirus simple recombinant portant la valence NSmG<sub>N</sub>FVR notés RecNSmG<sub>N</sub>FVR. Par mesure de précaution, quatre de ces treize capripoxvirus simple recombinants ont été purifiés par dilutions limites sous pression sélective *Ecogpt*. Deux de ces 4 virus ont été produits à large échelle sur la lignée cellulaire OA3.Ts. Un seul de ces recombinants, le recombinant K557, a été concentré à l'aide de colonnes Centricon Plus 70 (Millipore) et a fait l'objet des études de protection et d'immunogénicité. L'évaluation de l'effet protecteur conférée par le capripoxvirus a été réalisée chez la souris avec une épreuve infectieuse FVR et la réponse immunitaire induite par ce candidat vaccinal a été évaluée chez la chèvre sans épreuve infectieuse FVR.

La reproduction expérimentale de la maladie due au virus FVR est complexe, la souche d'épreuve, la charge virale ainsi que la voie d'inoculation étant autant de facteurs de variation.. Un certain nombre de souches (ZH 501, ZH 548, M35/74, AR 3068) a été utilisé dans des épreuves infectieuses et différents modèles animaux ont été testés :

- le modèle murin outbred NIH Swiss (Heise *et al.*, 2009),
- les souris transgéniques Balb/c, H2d haplotype,  $\alpha$ 1,3 galactosyltransférase-KO (Mandell *et al.*, 2010),
- les rats Wistar-Furth (Mandell *et al.*, 2010),
- des souris Balb/c (Lagerqvist *et al.*, 2009, Koertekaas *et al.*, 2010, Wallace *et al.*, 2006),
- des souris C57BL/6 (ScanBur BK) (Näslund *et al.*, 2009).

Les exemples sont nombreux, à la mesure de cette complexité à reproduire les signes cliniques observés lors d'une infection naturelle dans des expérimentations animales. L'âge des animaux est également un point crucial dans ces essais expérimentaux, plus les animaux sont jeunes, meilleure est la sensibilité à l'infection.

### **Le modèle murin : la souris *Mus m. musculus***

Afin d'évaluer l'effet protecteur de la construction vaccinale capripoxvirus simple recombinant NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub> pour la FVR, deux essais expérimentaux ont été conduits chez la souris. La lignée murine *Mus m. musculus* MBT/*Pas* utilisée pour nos essais a la particularité d'être résistante à l'infection par le virus West Nile et le virus Influenza de type A alors qu'elle s'avère être une lignée très sensible à l'infection FVR, exprimant des signes cliniques avec une virémie forte et précoce aboutissant à une mort rapide en 3 à 5 jours. Cette observation est vraisemblablement relative à l'impossibilité de cette lignée murine à induire une réponse immunitaire innée complète (Do Valle *et al.*, 2010).

En adoptant ce type de modèle animal avec une reproduction complète des signes cliniques de la FVR, l'épreuve infectieuse a permis de conclure de façon pertinente sur le rôle protecteur de notre candidat-vaccin. Deux expérimentations ont été réalisées. La première

expérimentation a laissé penser à un début de protection chez l'hôte, marquée par un décalage dans le temps de la survenue de la mortalité. La seconde expérience conduite sur le même type de souris nous a permis de confirmer l'existence d'une protection totale des animaux administrés avec le candidat-vaccin Rec NS<sub>m</sub> NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub>-FVR et soumis à une épreuve infectieuse avec la souche ZH548 du virus FVR. La protection était évaluée par les paramètres de survie/retard de mortalité/mortalité. Ainsi sur les 4 souris vaccinées par le recombinant capripoxvirus FVR et éprouvées par la souche virulente ZH548, trois d'entre elles ont survécu. En comparant ces résultats à ceux du lot de souris « contrôle » ayant reçu du vaccin capripoxvirus-HPPR, 3 des 4 souris sont mortes. Comme attendu toutes les souris du lot témoin positif, vaccinées par le clone 13 ont survécu. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par D. Wallace (Wallace *et al.*, 2005) malgré la différence du type de souris testée (souche MBT plus sensible au virus de la FVR que la souche Balb/c). Alors que la souche recombinante utilisée dans les travaux de Wallace est la souche *Neethling* de la dermatose nodulaire exprimant les gènes NS<sub>m</sub>NS<sub>m</sub>G<sub>N</sub>Gc, la souche utilisée dans le cas de notre construction est la souche KS1 qui n'exprime pas le gène Gc. Les mêmes résultats ont également été obtenus sans la valence Gc dans le modèle murin et caprin (Soi *et al.*, 2010). Ainsi, le fait de n'exprimer que la G<sub>N</sub> dans la construction vaccinale induit une protection totale des animaux éprouvés : suite à une épreuve infectieuse de FVR, des souris immunisées par deux injections d'un baculovirus exprimant seulement la protéine G<sub>N</sub> ont été protégées contre une épreuve infectieuse (Schmaljohn *et al.*, 1989).

Plusieurs conditions différaient entre la première et la seconde de nos expérimentations sur la souris. La charge virale était passée de 10<sup>4,9</sup> DICT<sub>50</sub> à 10<sup>5,9</sup> DICT<sub>50</sub>, les voies d'inoculation (de i.m., s. c. à i.m., s.c. et i.p.). Les conditions utilisées dans la seconde expérimentation sont en faveur d'une protection complète. Bien que le modèle animal choisi reste un système non répliquatif pour les capripoxvirus. Des anticorps neutralisants dirigés contre le virus FVR ont été mis en évidence suite aux 2 immunisations par voie i.p., s.c., i.m. et la présence de ces anticorps a été confirmée chez les animaux éprouvés par un effet rappel. Les titres d'anticorps neutralisants obtenus après vaccination variaient de 5 à 30 pour 6 des 8 souris du groupe Cpox-FVR. Les souris composant le groupe témoin ayant reçu le Cpox-HPPR, n'ont présenté aucune séroconversion pour le virus FVR. Les titres viraux obtenus pour ce groupe sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour le groupe témoin à J28 (test Kruskal-Wallis, p<0,05), c'est-à-dire une semaine après la seconde immunisation. Une séroconversion a été largement détectée chez toutes les souris composant le groupe Témoin Contrôle positif (Clone

13). La détection des anticorps anti-capripoxvirus par la technique IF n'a pas à ce jour permis d'identifier de réelle séroconversion, il faut toutefois rappeler ici que les souris ne sont pas considérées comme des hôtes répliatifs pour les capripoxvirus de manière générale. L'analyse de la réponse cellulaire a été conduite par le biais de la mesure de la lymphoprolifération après restimulation *in vitro* des splénocytes avec des préparations antigéniques spécifiques du virus FVR, souche *Smithburn*. Dans le cas de la première expérimentation, une différence significative (test Mann et Whitney,  $p < 0,05$ ) a été observée au point J+33 (c'est-à-dire 2 jours après l'épreuve infectieuse) entre le groupe Test CpoX-FVR et le groupe Témoin CpoX-HPPR, mais également entre le groupe Témoin positif Clone 13 et le groupe Témoin CpoX-HPPR aussi bien pour les sous-populations lymphocytaires de type CD4 que CD8. Les résultats de la réponse cellulaire obtenus lors de la seconde expérimentation sont inexploitable suite à l'apoptose cellulaire observée lors de la restimulation antigénique des cellules spléniques. Pour compléter l'analyse de la réponse cellulaire, le dosage des cytokines en tant que protéines sécrétées a été réalisé à partir de surnageants de culture de splénocytes isolés à partir des rates des souris immunisées. Ces splénocytes ont été restimulés *in vitro* par des préparations antigéniques spécifiques de KS1 et de FVR. La technologie CBA a été utilisée à cet effet et a permis de doser les cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  et TNF $\alpha$  à partir de 50  $\mu$ l de surnageant. Pour la première expérimentation, aucune différence significative n'a été obtenue entre les 3 groupes de souris quelles que soient les cytokines dosées. En revanche, lors de la seconde expérimentation, les niveaux d'expression des cytokines IL-2, IL-4 et IFN- $\gamma$  ont été significativement supérieurs dans le groupe de souris ayant reçu le témoin positif vaccin Clone 13 (virus atténué ayant perdu la majeure partie du gène NSs) comparativement aux 2 autres groupes CpoX-HPPR et CpoX-FVR. Ces premiers résultats seraient à confirmer par d'autres essais. Il semble d'après nos 2 essais murins que notre candidat vaccinal n'induit pas de bouleversement notable dans la réponse cellulaire vis-à-vis du gène d'intérêt exprimé. Le second modèle expérimental, le modèle caprin que nous avons utilisé est connu pour être un système répliatif pour les capripoxvirus.

### **Le modèle caprin :**

Dans le but d'évaluer l'immunogénicité induite par le simple recombinant capripoxvirus – NSmNS<sub>m</sub>G<sub>N</sub>-FVR (dont le rôle protecteur a été validé chez la souris), une expérimentation chez les chèvres, hôtes répliatifs pour les capripoxvirus a été réalisée. L'analyse de la

réponse humorale et cellulaire a été étudiée. Pour 4 des 5 animaux constituant le groupe Cpox-FVR, des anticorps neutralisants anti-FVR ont été détectés dès J28 ce qui correspond à une semaine après la seconde immunisation (J21). Les titres viraux obtenus pour le groupe Cpox-FVR sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour le groupe témoin Cpox-HPPR à tous les points de J28 à J70 (test Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Aucune séroconversion n'a été détectée pour les chèvres du groupe Témoin. De même, nous avons réalisé la détection d'anticorps dirigés contre la PPR dans les deux groupes. Les résultats obtenus étaient cohérents Les titres en anticorps neutralisants obtenus pour la PPR étaient du même ordre que ceux obtenus pour la FVR. L'effet protecteur du recombinant capripoxvirus H-PPR a déjà été validé à plusieurs reprises. Une séroconversion anti-capripoxvirus a été de même révélée chez toutes les chèvres, aussi bien celles qui ont reçu le Cpox-PPR que celles qui ont reçu le Cpox-FVR.

L'analyse de la réponse cellulaire engendrée dans le cas du modèle caprin comporte elle aussi plusieurs interrogations. Une tendance nette de prolifération spécifique du virus FVR se dégage entre le groupe Cpox HPPR et le groupe Cpox-NSmG<sub>N</sub> FVR, cette différence n'est pourtant pas significative par le test de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Il est à noter que lors de ces expériences de restimulation *in vitro*, bien souvent une autoproliération cellulaire est observée et l'hétérogénéité des réponses est augmentée puisque nous utilisons des chèvres « outbred ». Les tests statistiques ne nous permettent alors que rarement d'obtenir une significativité. De même, les résultats de prolifération spécifique du capripoxvirus ne montrent aucune différence significative entre les deux groupes, ce qui est attendu. Aucune différence à chacun des points de cinétique testés (hebdomadaire de J0 à J49) n'a été obtenue. Lors de l'analyse de la lymphoprolifération spécifique du virus KS1, une tendance semble apparaître à J35 et J41 en faveur du groupe test Cpox- FVR, ce qui n'est pas attendu. En effet, le nombre de doses administrées est identique dans les 2 groupes de chèvres Il a été démontré *in vitro* que le vecteur capripoxvirus engendre un effet immunosuppresseur sur la prolifération des cellules du sang périphérique, ceci peut éventuellement expliquer la nature des résultats de restimulation *in vitro* par des préparations antigéniques de la souche KS1 non inactivée (Perrin *et al.*, 2007).

## **Propositions d'amélioration du système vaccinal capripoxvirus-FVR**

Le rôle protecteur de notre candidat vaccinal capripoxvirus a été mis en évidence suite à une épreuve infectieuse dans un système non réplcatif, la souris. Les premiers résultats obtenus étaient encourageants mais n'avaient pas permis d'obtenir une protection complète. Un retard de mortalité avait été clairement observé, ce qui était important dans le cas du modèle MBT/Pas. Des améliorations étaient donc nécessaires. L'augmentation de la dose vaccinale de  $10^{4,9}$  DICT<sub>50</sub> à  $10^{5,9}$  DICT<sub>50</sub> associée à un changement de la voie d'administration qui était s.c.(J0), s.c., i.m (J21) et qui devint s.c., i.m, i.p. à J0 et J21, ont permis d'obtenir un effet protecteur lors du second essai réalisé chez la souris. Ainsi pour améliorer notre système vaccinal, nous pouvons d'une part, travailler sur les constructions plasmidiques en modifiant notamment les promoteurs pour augmenter le niveau d'expression et d'autre part, de stimuler davantage ou différemment la présentation antigénique et de façon plus globale la réponse immunitaire.

### ***Amélioration des constructions plasmidiques :***

Il est possible d'augmenter le niveau d'expression des différentes protéines en modifiant les promoteurs. En effet, nous avons montré que le promoteur pIL1 dérivé de la vaccine (Liu *et al.*, 2004) avait une capacité d'expression de 6 à 7 fois supérieure à celle des autres promoteurs utilisés classiquement (promoteur p7.5 ou promoteur synthétique pS). Il serait intéressant de valider nos constructions plasmidiques sous ce promoteur fort et de comparer le niveau d'expression protéique, notamment via l'ARNm, avec les constructions sous pS.

A terme, dans les virus recombinants, il est recommandé que les marqueurs de sélection (GPT, GNT) soient éliminés pour des raisons d'éthique et de contraintes réglementaires liées à l'utilisation d'Organismes Génétiquement Modifiés.



## ***Amélioration de la réponse immunitaire***

### **Utilisation d'adjuvants**

La plupart des protéines sont peu ou non immunogènes lorsqu'elles sont administrées de façon native. Le vecteur capripoxvirus peut en théorie palier à ce problème car il est capable de stimuler efficacement les réponses immunitaires de type cellulaire (Aspden *et al.*, 2003 ; Wallace & Viljoen, 2005). Il serait intéressant d'essayer d'accroître la réponse immunitaire par l'insertion de gènes codants pour des cytokines de type facteur stimulant les populations de granulocytes et de macrophages, GM-CSF (Granulocytes-Macrophages Colony-Stimulating Factor) ou le facteur de croissance hématopoïétique, Flt3L, qui semblent capables d'aider au recrutement local des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes et à la réponse cellulaire en augmentant la réponse immunitaire de type CD4<sup>+</sup> (Mwangi *et al.*, 2002). Des travaux récents de Bardhwai, 2010 ont mis en évidence la conception d'un alphavirus, vecteur vaccinal exprimant la G<sub>N</sub> et une molécule du complément la C3d. L'utilisation de ce vecteur au cours d'une épreuve infectieuse chez la souris a donné une importante séroconversion nettement supérieure à celle engendrée par la souche atténuée vaccinale MP-12 (Bardhwai *et al.*, 2010). Ainsi, pour proposer un calendrier vaccinal avec une seule injection, il serait intéressant d'inclure dans nos constructions plasmidiques, en plus des gènes d'intérêts, de tels gènes immunostimulants.

### **Voie d'immunisation**

La voie par laquelle l'antigène est introduit dans l'organisme affecte à la fois l'amplitude et le type de réponse. Il faut adapter cette voie au tropisme viral d'une part, à l'animal manipulé et au type de réponse immunitaire souhaité. Habituellement l'antigène est injecté par voie sous-cutanée (SC). D'autres possibilités telles que la voie intradermique (ID) ou intramusculaire (IM) sont envisageables. On peut également recourir à l'administration par voie mucoale, c'est-à-dire ingestion par voie orale ou inhalation par voie intranasale.

## ***Amélioration de la présentation antigénique***

La présentation antigénique par les vaccins simple recombinants peut-être optimisée pour obtenir une réponse immunitaire maximale. Des études récentes ont montré qu'un vaccin

recombinant canarypoxvirus co-exprimant les deux protéines de la capside externe VP2 et VP5 du virus de la bluetongue, induisait une excellente protection des moutons après une épreuve homologe (Boone *et al.*, 2007). De même que l'incorporation directe d'un antigène au sein même du virion par fusion avec une protéine d'enveloppe est différent de ce qui a pu être observé avec l'inclusion dans le virion de protéines de l'hôte lors du cycle de morphogenèse virale (Vanderplasschen *et al.*, 1998 ; Gomez & Esteban, 2001; Krauss *et al.*, 2002). Jusqu'ici, seules des expériences de fusion d'antigène étranger avec la protéine B5R (protéine d'EEV) du virus de la vaccine ont été menées (Kwak *et al.*, 2004). Ainsi, des virus recombinés dans lesquels le domaine cytoplasmique de la protéine B5R a été remplacé par la protéine Gag du virus HIV-1 ont été construits. Des essais ont été réalisés en utilisant ce virus recombinant pour protéger des souris contre une souche de *Listeria* exprimant cette même protéine Gag. Une protection partielle a pu être observée. De tels résultats montrent qu'un poxvirus exprimant un antigène étranger incorporé dans les virions EEV pourrait constituer une meilleure stratégie vaccinale que la recombinaison homologe classique. Cette stratégie permettrait d'améliorer la réponse immunitaire induite par l'antigène étranger comparé au virus de la vaccine recombiné standard.

## CONCLUSION et PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de générer treize capripoxvirus recombinants contre la FVR dont 2 ont été purifiés et ont fait l'objet à la fois des évaluations d'immunogénicité et d'effet protecteur. Chez la chèvre, considérée comme modèle réplcatif pour les capripoxvirus, la détection d'anticorps neutralisants anti-FVR à des titres comparables que ceux induits contre la PPR par le recombinant capripoxvirus-HPPR laisse à penser que nos constructions seraient « protectrices » chez la chèvre. L'analyse de la réponse cellulaire a également pu montrer une tendance à la lymphoprolifération spécifique du virus FVR entre J35 et J41. Les expérimentations animales menées chez la souris avec une épreuve infectieuse en laboratoire de confinement 3 ont permis de montrer l'effet protecteur de nos constructions.

Ce travail de thèse a permis également de générer quatre capripoxvirus double recombinants contre la PPR et la FVR. La purification de ces doubles recombinants n'est pas simple, la technologie des billes magnétiques pourrait être une solution. Une autre solution serait la modification de notre technique de sélection des plages de lyse, en passant d'un système de PCR à un système d'hybridation avec sonde froide spécifique d'un fragment à cheval sur le virus sauvage et le plasmide par Southern blot. La purification du double recombinant devrait trouver une solution rapidement. Il pourrait alors être envisagé d'autres essais expérimentaux chez la chèvre avec des épreuves infectieuses de chacune des valences, capripoxvirus, PPR et FVR afin de conclure sur l'effet protecteur pour les 3 valences.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and J. S. Pober.** 2000. General properties of immune responses, p. 3-16. In W. Schmitt, H. N. Hacker, and J. Ehlers (eds.), Cellular and molecular immunology. Saunders W.B. company, Philadelphia, Pennsylvania.

**Abdo-Salem, S., Gerbier, G., Bonnet, P., Al-Qadasi, M., Tran, A., Thiry, E., Al-Eryni, G., Roger, F.** 2006. Descriptive and spatial epidemiology of Rift valley fever outbreak in Yemen 2000-2001. *Ann N Y Acad Sci.*, 1081: 240-2.

**Abehsira-Amar, O., Gibert, M., Jolij, M., Thèze, J., Jankovic, D.L.** 1992. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. *J Immunol.* 148(12):3820-9.

**Alba, R., Bosch, A., Chillon, M.** 2005. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy*, 12, S18–S27.

**Alkhatib, G., Briedis, D.J.** 1988. High-level eucaryotic *in vivo* expression of biologically active measles virus hemagglutinin by using an adenovirus type 5 helper-free vector system. *Journal of Virology* 62: 2718–2727.

**Al-Hazmi, M., Ayoola, E.A., Abdurahman, M., Banzal, S., Ashraf, J., El-Bushra, A., Hazmi A., Abdullah, M., Abbo, H., Elamin, A., Al-Sammani, el-T., Gadour, M., Menon, C., Hamza, M., Rahim I, Hafez, M., Jambavalikar, M., Arishi, H., Aqeel, A.** 2003. Epidemic Rift Valley fever in Saudi Arabia: a clinical study of severe illness in humans. *Clinical Infectious Diseases*, 36(3): 245-52.

**Anderson, G.W. Jr., Saluzzo, J.F., Ksiazek, T.G., Smith, J.F., Ennis, W., Thureen, D., Peters, C.J., Digoutte, J.P.** 1989. Comparison of *in vitro* and *in vivo* systems for propagation of Rift Valley fever virus from clinical specimens. *Research in virology*, 140 (2) : 129-38.

**Anderson, J., McKay J. A. and Butcher R. N.** 1991. The use of monoclonal antibodies in competitive ELISA for the detection of antibodies to PPR and pest des petits ruminants viruses. Panel Proceedings IAEA-SM-318, International Symposium on Nuclear and related techniques in animal production and health, Vienna, Austria.

**Anderson, J. and D. Sammin,** 2005. *Peste des petits ruminants*. EMPRES bulletin des maladies animales transfrontières. 27, 12-15.

**Andrew, M.E., Coupar, B.E.** 1993. Biological effects of recombinant vaccinia virus-expressed interleukin 4. *Cytokine*, 4(4) : 281-286.

**Anyamba, A., Chretien, J.P., Small, J., Tucker, C.J., Formenty, P.B., Richardson, J.H.** 2009. Prediction of a Rift Valley fever outbreak. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 955-959.

**Assarsson E, Greenbaum JA, Sundstrom M, et al.** 2008. Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 2140-2145.

**Aspden K., Passmore JA., Tiedt F., Williamson AL.** 2003. Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector. *Journal of General Virology*, 84, 1985–1996.

**Barnard, B.J., Botha, M.J.** 1977. An inactivated rift valley fever vaccine. *J S Afr Vet Assoc.* 48(1):45-8.

**Barnard, B.J.** 1979. Rift Valley fever vaccine--antibody and immune response in cattle to a live and an inactivated vaccine. *J S Afr Vet Assoc.*, 50(3): 155-7.

**Baron, M. D., A. C. Banyard, S. Parida, and T. Barrett.** 2005. The Plowright vaccine strain of rinderpest virus has attenuating mutations in most genes. *J. Gen. Virol.* **86**:1093–1101.

**Barr, J.N., Rodgers, J.W. & Wertz G.W.** 2006. Identification of the Bunyamwera Bunyavirus Transcription Termination Signal. *Journal of General Virology* **87**

**Barr, J.N.** 2007. Bunyavirus mRNA Synthesis is Coupled to Translation to Prevent Premature Transcription Termination. *RNA*. **13**.

**Barrett, T.** 1999. *Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores.* *Vet Microbiol*, 69 (1-2): p. 3-13.

**Bengali, Z., Townsley, A.C., Moss, B.** 2009. Vaccinia virus strain differences in cell attachment and entry. *Virology*, 389(1-2):132-140.

**Bergelson, J. M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W.** 1997. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320 – 1323.

**Berhé, G., Minet, C., Le Goff, C., Barrett, T., Ngangnou, A., Grillet, C., Libeau, G., Fleming, M., Black, D.N., Diallo, A.** 2003. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *Journal of virology*, 77(2): 1571-7.

**Bertagnoli, S.** 2003. Poxvirus. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes.* Eds Tec & doc. Tome 1, pp. 407-414.

**Bhardwaj, N., Heise, M.T., Ross, T.M.** 2010. Vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or alphavirus replicons expressing gn protects mice against Rift Valley fever virus. *PLoS Negl Trop Dis.*, 4(6):e725.

**Bird, B.H., Bawiec, D.A., Ksiazek, T.G., Shoemaker, T.R, Nichol, S.T.** 2007. Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus. *J Clin Microbiol.*,45(11):3506-13.

**Bird, B.H., Githinji, J.W., Macharia, J.M., Kasiiti, J.L., Muriithi, R.M., Gacheru, S.G., et al.** 2008a. Multiple virus lineages sharing recent common ancestry were associated with a Large Rift Valley fever outbreak among livestock in Kenya during 2006-2007. *Journal of Virology*, 82 :11152-66.

**Bird, B.H., Albariño, C.G., Hartman, A.L., Erickson, B.R., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T.** 2008b. Rift valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge, and allows for differential identification of infected and vaccinated animals. *Journal of Virology*, 82(6):2681-91.

**Bird, B.H., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., Maclachlan, N.J.** 2009. Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc.*, 234 (7): 883-93.

**Bishop, D.H., Calisher, C.H., Casals, J., Chumakov, M.P., Gaidamovich, S.Y., Hannoun, C., Lvov, D.K., Marshall, I.D., Oker-Blom, N., Pettersson, R.F., Porterfield, J.S., Russell, P.K., Shope, R.E., Westaway, E.G.** 1980. Bunyaviridae. *Intervirology* 14.

**Blancou, J. Kieny, M., Lathe, R., Lecocq, J.P., Pastoret, P., Soulebot, J.P., Desmettre, P.** 1986. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, 322, 373-375.

**Blaney, J.E. Jr., Nobusawa, E., Brehm, M.A., Bonneau, R.H., Mylin, L.M., Fu, T.M., Kawaoka, Y., Tevethia, S.S.** 1998. Immunization with a single major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte recognition epitope of herpes simplex virus type 2 confers protective immunity. *Journal of Virology*, 72:9567–9574.

**Blasco, R., Sisler, J.R., Moss, B.** 1993. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *Journal of Virology*, 67(6): 3319-3325.

**Blasco, R., Moss, B.** 1992. Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. *Journal of Virology*, 66(7): 4170-4179.

**Boone, J.D., Balasuriya, U.B., Karaca, K., Audonnet, J.C., Yao, J., He, L., Nordgren, R., Monaco, F., Savini, G., Gardner, I.A., Maclachlan, N.J.** 2007. Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine*, 8; 25(4):672-8.

**Bodjo, S.** 2007. Etude de la nucléoprotéine des virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants : caractérisation moléculaire des interactions protéiques et des structures antigéniques. Thèse de doctorat université de Montpellier II, p. 133.

**Bonnafous P., Perrault M., Le bihan O., Bartosch B., Lavillette D., Penin F., Lambert O., Pecheur EI.** 2010. Characterization of hepatitis C viral pseudoparticles by cryo-electron microscopy using functionalized magnetic nanobeads. *J Gen Virol.*, **91**, 1919-1930

**Bouet-Cararo, C., Contreras, V., Fournier, A., Jallet, C., Guibert, J.M., Dubois, E., Thiery, R., Bréard, E., Tordo, N., Richardson, J., Schwartz-Cornil, I., Zientara, S., Klonjowski, B.** 2011. Canine adenoviruses elicit both humoral and cell-mediated immune responses against rabies following immunisation of sheep. *Vaccine*, 29(6):1304-10.

**Bouloy, M., Flick, R.** 2009. Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antiviral Res*, 84(2):101-18.

**Bourdin, P. & Laurent-Vautier, A.** 1967. Note sur la structure du virus de la PPR. *Revue Elev. Med Pays Trop.*, 20 : 383-386.

**Boyle D.B., Coupar A.E.H.** A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses. *Gene*, **1988**, 65 : 123-128.

**Brandler, S., Tangy, F.** 2008. Recombinant vector derived from live attenuated measles virus: potential for flavivirus vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 31(2-3):271-91.

**Brandler, S., Ruffie, C., Najburg, V., Frenkiel, M.P., Bedouelle, H., Desprès, P., Tangy, F.** 2010. Pediatric measles vaccine expressing a dengue tetravalent antigen elicits neutralizing antibodies against all four dengue viruses. *Vaccine*, 28(41): 6730-9.

**Brochier, B., Languet, B., Blancou, J., Thomas, I., Kieny, M.P., Costy, F., Desmettre, P., Pastoret, P.P.** 1989. Use of recombinant vaccinia rabies virus for oral vaccination of wildlife against rabies. *Journal of wildlife diseases*, 25:540.

**Brochier, B., Kieny, M.P., Costy, F., Coppens, P., Baudouin, B., Lecocq, J.P., Languet, B., Chappuis, G., Desmettre, P., Afiademanyo, K., Libois, R., Pastoret, P.P.** 1991. Large scale eradication of rabies with a recombinant vaccinia-rabies virus. *Nature*, 354:520-522.

**Brochier, B., Kieny, M.P., Costy, F., Coppens, P., Baudouin, B., Lecocq, J.P., Languet, B., Mosselmans, F., Beier, R., Lecomte, L., Mullier, P., Roland, H., Kervyn, T., Renders, C., Escutenaires, S., Pastoret, P.P.** 2001. Elimination de la rage en Belgique par la vaccination du renard roux (*Vulpes*). *Annales de médecine vétérinaire*, 145:293-305.

**Broyles, S.S.** 2003. Vaccinia virus transcription. *J. Gen. Virol*, 84(Pt 9):2293-2303.

**Brown, K., Gao, W., Alber, S., Trichel, A., Murphey-Corb, M., Watkins, S.C., Gambotto, A., Barratt-Boyes, S.M.** 2003. Adenovirus-transduced dendritic cells injected into skin or lymph node prime potent simian immunodeficiency virus-specific T cell immunity in monkeys. *J Immunol*, 171: 6875–6882

**Bublot, M., Pritchard, N., Swayne, D. E., Selleck, P., Karaca, K., Suarez, D. L., Audonnet, J. C. and T. R. Mickle.** 2006. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, 1081: 193–201.



**Buller, R.M., Chakrabarti, S., Moss, B., Fredrickson, T.** 1988. Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology*, 164(1):182-192.

**Buller, R.M.L., Palumbo G.J.** 1991. Poxviruses pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, 55(1): 80-122.

**Burton, D. R., Williamson, R. A. and P. W. Parren.** 2000. Antibody and virus: binding and neutralization. *Virology*, 270:1-3.

**Buller R.M., Smith G.L., Cremer K., Notkins A.L., Moss B.** Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature*, **1985**, 317 : 813-815.

**Buxton, D., and E. A. Innes.** 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*, 110: S11–S16.

**Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L. et al.** 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology*, 264(2):298-318.

**Cao, J.X., Gershon, P.D., Black, D.N.** 1995. Sequence analysis of HindIII Q2 fragment of capripoxvirus reveals a putative gene encoding a G-protein-coupled chemokine receptor homologue. *Virology*, 209: 207-12.

**Caplen, H., Peters, C.J., Bishop, D.H.** 1985. Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development. *J Gen Virol*, 66 ( Pt 10):2271-7.

**Carroll M.W., Moss B.** *E. Coli* beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques*, **1995**, 19 : 352-354.

**Carter, G.C., Rodger, G., Murphy, B.J. et al.** 2003. Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J. Gen. Virol*, 84(Pt 9): 2443-2458.

**Castrucci, M.R., Hou, S., Doherty, P.C., Kawaoka, Y.** 1994. Protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection by immunization of mice with an influenza virus containing an LCMV epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 68:3486–3490.

**Chahroudi, A., Chavan, R., Kozyr, N., et al.** 2005. Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. *J. Virol*, 79(16):10397-10407.

**Chakrabarti S., Sisler J. R., and Moss B.** Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *BioTechniques*, **1997**, 23 : 1094-1097.

**Chanda, P.K., Natuk, R.J., Dheer, S.K., Lubeck, M.D., Bhat, B.M., Mason, B.B., Greenberg, L., Mizutani, S., Davis, A.R., Hung, P.P.** 1990. Helper independent

recombinant adenovirus vectors: expression of HIV env or HBV surface antigen. *Int Rev Immunol* 7:67–77.

**Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D., Mosmann, T.R.** 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med.* ,166(5):1229-44.

**Chicho, F.J., Rodri'guez, M.J., Risco, C., Fraile-Ramos, A., Fernandez, J.J., Esteban, M. and J.L. Carrascosa**1. 2009. Membrane remodelling during vaccinia virus morphogenesis. *Biol. Cell*, 101, 401–414

**Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S., Chang, W.** 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol*, 72(2):1577-1585.

**Chung, C., Huang, C., Chang, W.** 2005. Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *J. Virol*, 79(3):1623-1634.

**Clements, A.C., Pfeiffer, D.U., Martin, V., Pittiglio, C., Best, N., Thiongane, Y.** 2007. Spatial risk assessment of Rift Valley fever in Senegal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7: 203-16.

**Collett ,M.S., Purchio, A.F., Keegan, K., Frazier, S., Hays, W., Anderson, D.K., Parker, M.D., Schmaljohn, C., Schmidt, J., Dalrymple, J.M.** 1985. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Rift Valley fever virus. *Virology*, 15;144(1):228-45.

**Couacy-Hymann, E., Bodjo, S.C., Koffi, M.Y., Kouakou, C., Danho, T..** 2009. The early detection of peste-des-petits-ruminants (PPR) virus antigens and nucleic acid from experimentally infected goats using RT-PCR and immunocapture ELISA techniques. *Res Vet Sci.*,87(2) : 332-5.

**Curtiss, R. 3rd, Xin, W., Li, Y., Kong, W., Wanda, S.Y., Gunn, B., Wang, S.** 2010. New technologies in using recombinant attenuated Salmonella vaccine vectors. *Crit Rev Immunol.*, 30(3): 255-70.

**Cyrklaff, M., Risco, C., Fernandez, JJ, et al.** 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 102(8):2772-2777.

**Damas Rocha, C., Costa, B., Alexandre, C., Machado, V., Oscar Bruña-Romero, O.** 2004. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *International microbiology*, 7 : 83–94.

**Daubney, R., Hudson, J.R., Gamham, P.C.** 1931. Enzootic hepatitis of Rift Valley fever: an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa. *J. Pathol. Bacteriol.*; 34: 545-9.

**Davies, F.G.** 1976. Characteristics of a virus causing a pox disease in sheep and goat in Kenya with observations on the epidemiology and control. *The Journal of hygiene*, 76:163-171.

**De Blas, N., Ortega, C., Frankena, K., Noordhuizen, K., Thrusfield, M.** 2000. **Win Episcopo 2. Version: 2.0.** [www.clive.ed.ac.uk/winepiscopo](http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscopo)

**De Boer, S.M., Kortekaas, J., Antonis, A.F., Kant, J., van Oploo, J.L., Rottier, P.J., Moormann, R.J., Bosch, B.J.** 2010. Rift Valley fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge. *Vaccine*, 28(11):2330-9

**DeLange, A.M., McFadden, G.** 1990. The role of telomeres in poxvirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 16371-92.

**Del Valle, J.R., Devaux, P., Hodge, G., Wegner, N.J., McChesney, M.B., Cattaneo, R.** 2007. A vectored measles virus induces hepatitis B surface antigen antibodies while protecting macaques against measles virus challenge. *J Virol.*, 81(19):10597-605.

**Desprès, P., Combredet, C., Frenkiel, M.P., Lorin, C., Brahic, M., Tangy, F.** 2005. Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis. *J Infect Dis.*, 191(2):207-14.

**De Waal, D. T., and M. P. Combrink.** 2006. Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet. Parasitol.* 138:88–96.

**Diallo, A., Barrett, T., Lefèvre, P.C., Taylor, W.P.** 1987. Comparison of proteins induced in cells infected with RP and PPR viruses. *J Gen. Virol.* 68: 2033-2038.

**Diallo, A., Barrett, T., Barbron, M., Subbarao, M.S. and Taylor, W.P.** 1989a. Differentiation of rinderpest and PPR viruses using specific cDNA clones. *J Virol Methods*, 23: 127-136.

**Diallo, A., Taylor, WP., Lefèvre, P.C., Provost, A.** 1989b. Atténuation d’une souche virulente de PPR: candidat pour un vaccin homologue vivant, *Revue Elev. Méd Trop. Vét. Trop* , 42 (3), 311-319

**Diallo, A., Libeau, G., Couacy-Hymann, E., Barbron, M.** 1995. Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. *Vet Microbiol*, 44(2-4): p. 307-17.

**Diallo, A., Minet, C., Berhé, G., Le Goff, C., Black, D.N., Fleming, M., Barrett, T., Grillet, C., Libeau, G.** 2002. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969:88-91.

**Diallo, A.**, 2003. *Peste des petits ruminants*, in *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. p. 307-321.

**DiNapoli, J.M., Nayak, B., Yang, L., Finneyfrock, B.W., Cook, A., Andersen, H., Torres-Velez, F., Murphy, B.R., Samal, S.K., Collins, P.L., Bukreyev, A.** 2010. Newcastle disease virus-vectored vaccines expressing the hemagglutinin or neuraminidase protein of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus protect against virus challenge in monkeys. *J Virol.*, 84(3):1489-503.

**Dominguez J., Lorenzo M.M., Blasco R.** Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 1998, 220, 115-121.

**Do Valle, T.Z., Billecocq, A., Guillemot, L., Alberts, R., Gommet, C., Geffers, R., Calabrese, K., Schughart, K., Bouloy, M., Montagutelli, X., Panthier, J.J.** 2010. A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever. *Journal of Immunology*, 15; 185(10) : 6146-56.

**Drillien, R., Spehner, D., Autran, B., Garin, D.** 2003. Les poxvirus : une famille de vecteurs. *Virologie*, volume 7, numéro 4, 243-53.

**Drosten, C., Götting, S., Schilling, S., Asper, M., Panning, M., Schmitz, H., Günther, S.** 2002. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.*, 40(7):2323-30.

**Dubbs D.R., Kits S.** 1964. Isolation and properties of vaccinia mutants deficient in TK inducing activity. *Virology*, 22 : 214-225.

**Dungu, B., Louw, I., Lubisi, A., Hunter, P., von Teichman, B.F., Bouloy, M.** 2010. Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine*, 28(29):4581-7.

**Duque, H., R. L. Marshall, B. A. Israel, and G. J. Letchworth.** 1989. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine*, 7: 513-520.

**Duteyrat, J., Gelfi, J., Bertagnoli, S.** 2006. Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. *Arch. Virol* , 151(11):2161-80

**Elliott, R.M., Schnaljohn, C.S., Collett, M.S.** 1991. Bunyaviridae Genome Structure and Gene Expression. In: Kolakofsky D (Ed). *Bunyaviridae*. Springer-Verlag Germany.

**Erlenhöfer, C., Duprex, W.P., Rima, B.K., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J.** 2002. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol.*, 83(Pt 6):1431-6.

**Els, N. T., Meeusen, Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P. and Gregers Jungersen. 2007.** Current Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (3) : 489-510 .

**Everett, H., McFadden, G.** 2002. Poxviruses and apoptosis: a time to die. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5(4):395-402.

**Fafetine, J.M., Tijhaar, E., Paweska, J.T., Neves, L.C., Hendriks, J., Swanepoel, R., et al.** 2007. Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of a N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants. *Vet Microbiol*, 121 : 29-38.

**Falkner F.G., Moss B.** *Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *Journal of virology*, **1988**, 62 : 1849-1854.

**Fassi-Fehri, M., Lefèvre, P.C.** 2003. Clavelée et variole caprine. In : Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, pp. 415-427.

**Fauquet, C.M.** 2005. Virus taxonomy. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball, Editors, *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, pp 328-347.

**Flick, R., Bouloy, M.** 2005. Rift Valley fever virus. *Curr Mol Med.*, 5(8):827-34

**Ferko, B., J. Stasakova, S. Sereinig, J. Romanova, D. Katinger, B. Niebler, H. Katinger, and A. Egorov.** 2001. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J. Virol.*, 75:8899-8908.

**Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A.** 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.*, 147(11):3815-22.

**Firestein, G.S., Roeder, W.D., Laxer, J.A., Townsend, K.S., Weaver, C.T., Hom, J.T., Linton, J, Torbett, B.E., Glasebrook, A.L.** 1989. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol.* , 143(2):518-25.

**Fischer, I., Barzu, S., Andreoni, C., Buisson, N., Brun, A., Audonnet, J.C.** 2003. DNA vaccination of neonate piglets in the face of maternal immunity induces humoral memory and protection against a virulent pseudorabies virus challenge. *Vaccine*, 21, 1732-1741.

**Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., Skalka, A. M.** 2003. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses* (ASM Press, Washington DC), 2nd Ed.

**Forsyth, M.A. & Barret, T.** 1995. Evaluation of PCR for the detection and characterization of rinderpest and PPR viruses for epidemiological studies. *Virus Research*, 39: 151-163.

**Franke, C.A., Rice, C.M., Strauss, J.H., Hruby, D.E.** 1985. Neomycin resistance as a dominant selectable marker for selection and isolation of vaccinia virus recombinants. *Molecular and cellular biology*, 5 : 1918-1924.

**Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W., Moss, B.** 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 8122- 8126.

**Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., Lieber, A.** 2003. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* 9: 1408 – 1412.

**Gahmberg, N., Kuismanen, E., Keranen, S. & Pettersson, R.F.** 1986. Uukuniemi Virus Glycoproteins accumulate in and Cause Morphological Changes of the Golgi Complex in the Absence of Virus Maturation. *Journal of Virology*, 57:3.

**Gallego-Gómez, J.C., Risco, C., Rodríguez, D., Cabezas, P., Guerra, S., Carrascosa, J.L., Esteban, M.** 2003. Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J Virol.*, 77:10606–10622

**Garcia, S., Crance, J.M., Billecocq, A., Peinnequin, A., Jouan, A., Bouloy, M., Garin, D.** 2001. Quantitative real-time PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds. *J Clin Microbiol.*, 39(12):4456-61.

**García-Sastre, A, Muster, T, Barclay, W.S., Percy, N., Palese, P.** 1994. Use of a mammalian internal ribosomal entry site element for expression of a foreign protein by a transfectant influenza virus. *J Virol.*, 68:6254–6261.

**García-Sastre, A.** 2000. Transfectant influenza viruses as antigen delivery vectors. *Advanced Virus Research*, 55:579–597

**Gargadennec, L. and A. Lalanne,** 1942. *La peste des petits ruminants*. Bull. Serv. Zoo. Epiz. AOF, 1942. **5**: p. 16-21.

**Gerdes, G.H.** 2002. Rift valley fever. The veterinary clinics of North America. *Food animal practice*, 18, (3): 549-555.

**Gerdes, G.H.** 2004. Rift valley fever. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 23 (2) : 613-623.

**Gerrard, S.R, Li, L., Barrett, A.D., Nichol, S.T.** 2004. Ngari virus is a Bunyamvera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. *J Virol* 2004 ; 78 : 8922-6.

**Gilbert, Y. & Monnier, J.** 1962. Adaptation du virus de la PPR aux cultures cellulaires. *Revue Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 15 : 321-335.

**Gibbs, E.P.J., Taylor, W.P., Lawman, M.P.J. and Bryant, J.** 1979. Classification of PPR virus as the fourth member of the Genus Morbillivirus. *Intervirology*, 11: 268-274.

**Giorgi, C.** 1996. Molecular Biology of Phleboviruses. In Elliott RM (ed.), *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York, N.Y (1996)

**Gomez, C.E., Esteban, M.** 2001. Recombinant proteins produced by vaccinia virus vectors can be incorporated within the virion (IMV form) into different compartments. *Arch Virol* 146, 875-92.

**Gonzalo, R.M., Rodríguez, D., García-Sastre, A., Rodríguez, J.R., Palese, P., Esteban, M.** 1999. Enhanced CD8+ T cell response to HIV-1 env by combined immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. *Vaccine*, 17(7-8):887-92.

**Gorchakov, R., Volkova, E., Yun, N., Petrakova, O., Linde, N.S., Paessler, S., Frolova, E., Frolov, I.** 2007. Comparative analysis of the alphavirus-based vectors expressing Rift Valley fever virus glycoproteins. *Virology*, 366(1): 212-25.

**Gourreau, J.M.** 2003. Ecthyma contagieux. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, pp 445-459.

**Graham, S. P., R. Pelle, Y. Honda, D. M. Mwangi, N. J. Tonukari, M. Yamage, E. J. Glew, E. P. de Villiers, T. Shah, R. Bishop, E. Abuya, E. Awino, J. Gachanja, A. E. Luyai, F. Mbwika, A. M. Muthiani, D. M. Ndegwa, M. Njehira, J. K. Nyanjui, F. O. Onono, J. Osaso, R. M. Saya, C. Wildmann, C. M. Fraser, I. Maudlin, M. J. Gardner, S. P. Morzaria, S. Loosmore, S. C. Gilbert, J. C. Audonnet, P. van der Bruggen, V. Nene, and E. L. Taracha.** 2006. *Theileria parva* candidate vaccine antigens recognized by immune bovine cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3286–3291.

**Habjan, M., Penski, N., Wagner, V., Spiegel, M., Overby, A.K., Kochs, G., Huiskonen, J.T., Weber, F.** 2009. Efficient production of Rift Valley fever virus-like particles: The antiviral protein MxA can inhibit primary transcription of bunyaviruses. *Virology*, 385(2):400-8.

**Haller, O., Kochs, G. & Weber, F.** 2006. The Interferon Response Circuit: Induction and Suppression by Pathogenic Viruses. *Virology* 344.

**Hardwick, J.M.** 2001. Apoptosis in Viral Pathogenesis. *Cell Death and Differentiation*, 8.

**Hansen S.G., Cope T.A, Hruby D.E.** Bizyme: a novel fusion protein-mediating selection of vaccinia virus recombinants by fluorescence and antibiotic resistance. *Biotechniques*, 2002, 32(5) : 1178-1180.

**Harrington, D.G., Lupton, H.W., Crabbs, C.L, Peters, C.J., Reynolds, J.A., Slone, T.W. Jr.** 1980. Evaluation of a formalin-inactivated Rift Valley fever vaccine in sheep. *Am J Vet Res.*, 41(10): 1559-64.

**Harrisona, S.C., Albertsc, B., Ehrenfeldd, E., Enquiste, L., Finebergf, H., Steven L. McKnightg, Mossh, B., O'Donnelli, M., Ploeghj, H., Schmidk, S.L., Walterl, K.P. and J. Theriotm.** 2004. Discovery of antivirals against smallpox. *PNAS*, 101 (31) : 11178–11192.

**He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.** 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *PNAS*, 95:2509–2514.

**Heise, M.T., Whitmore, A., Thompson, J., Parsons, M., Grobbelaar, A.A., Kemp, A., Paweska, J.T., Madric, K., White, L.J., Swanepoel, R., Burt, F.J.** 2009. An alphavirus replicon-derived candidate vaccine against Rift Valley fever virus. *Epidemiol Infect.*, 137(9): 1309-18.

**Hengartner, M.O.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770-776.

**Hevey, M., Negley, D., Pushko, P., Smith, J., Schmaljohn, A.** 1998. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology*, 251: 28–37.

**Hilleman, M.** 2002. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine*, 20:651–65.

**Hollinshead, M., Vanderplasschen, A., Smith, G.L., Vaux, D.J.** 1999. Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. *J. Virol.*, 73(2):1503-1517.

**Holman, D.H., Penn-Nicholson, A., Wang, D., Woraratanadharm, J., Harr, M.K., Luo, M., Maher, E.M., Holbrook, M.R., Dong, J.Y.** 2009. A complex adenovirus-vectored vaccine against Rift Valley fever virus protects mice against lethal infection in the presence of preexisting vector immunity. *Clin Vaccine Immunol.*, 16 (11): 1624-32.

**Hong, Y., Babiuk, L.A., and van Drunen, S., van den Hurk, L.** 2004. Priming with CpG-enriched plasmid and boosting with protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides and Quil A induces strong cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus NS3. *Journal of General Virology*, 85, 1533-1543.

**Howell, M.R., Nang, R.N., Gaydos, C.A., Gaydos, J.C.** 1998. Prevention of adenoviral acute respiratory disease in Army recruits: cost-effectiveness of a military vaccination policy. *Am J Prev Med*, 14:168–175.

**Hruby, D.E.** 1990. Vaccinia virus vectors: news strategies for producing recombinant vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3: 153-170.

**Hsiao, J.C., Chung, C.S., Chang, W.** 1999. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *Journal of Virology*, 73(10):8750-8761.



**Hu, S.L., Kosowski, S.G., Dalrymple, J.M.** 1986. Expression of AIDS virus envelope gene in recombinant vaccinia viruses. *Nature*, 320:537–540.

**Hu, L., Ngichabe, C., Trimarchi, C.V., Esposito, J.J., Scott, F.W.** 1997. Raccoon poxvirus live recombinant feline panleukopenia virus VP2 and rabies virus glycoprotein bivalent vaccine. *Vaccine*, 15 : 1466-1472.

**Hunter, P., Erasmus, B.J., Vorster, J.H.** 2002. Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep. *Onderstepoort J Vet Res.*, 69(1):95-8.

**Hubby, B., Talarico, T., Maughan, M., Reap, E.A., Berglund, P., Kamrud, K.I., Copp, L., Lewis, W., Cecil, C., Norberg, P., Wagner, J., Watson, A., Negri, S., Burnett, B.K., Graham, A., Smith, J.F., Chulay, J.D.** 2007. Development and preclinical evaluation of an alphavirus replicon vaccine for influenza. *Vaccine*, 25(48):8180-9.

**Ikegami, T., Makino, S.** 2009. Rift valley fever vaccines. *Vaccine*. Suppl 4:D69-72.

**Jin, H. & Elliott, R.M.** 1993. Characterization of Bunyamwera Virus S RNA That is Transcribed and Replicated by the L Protein Expressed from Recombinant Vaccinia Virus. *Journal of Virology*, 67: 3.

**Jin, H., Lu, B., Zhou, H., Ma, C., Zhao, J., Yang, C.F., Kemble, G., Greenberg, H.** 2003. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*, 306:18–24.

**Johnson E.A., Brown Jr B.W.** 1961. The spearman estimator for several dilutions assays. *Biometrics*, 17, 79-88.

**Johnston, J.B., Barrett, J.W., Chang, W.** 2003. Role of the serine-threonine kinase PAK-1 in myxoma virus replication. *J. Virol.*, 77(10):5877-5888.

**Jupp, P.G., Grobbelaar, A.A., Leman, P.A., Kemp, A., Dunton, R.F., Burkot, T.R., Ksiazek, T.G., Swanepoel, R.** 2000. Experimental detection of Rift Valley fever virus by reverse transcription-polymerase chain reaction assay in large samples of mosquitoes. *J Med Entomol.*, 37(3):467-71

**Kakach, L.T., Wasmoen, T.L., Collett, M.S.** 1988. Rift Valley fever virus M segment: use of recombinant vaccinia viruses to study Phlebovirus gene expression. *J Virology*, 62(3):826-33.

**Karaca, K., Bowen, R., Austgen, L.E., Teehee, M., Siger, L., Grosenbaugh, D., Loosemore, L., Audonnet, J.C., Nordgren, R., Minke, J.M.** 2005. Recombinant canarypox vectored West Nile virus (WNV) vaccine protects dogs and cats against a mosquito WNV challenge. *Vaccine*, 31; 23(29):3808-3813.

**Katz J.B., Middle L.A.** Evaluation of thymidine kinase and neomycin phosphotransferase II positive selection systems for recovery of genetically atypical and recombinant DNA vaccine viruses. *Biologicals*, 1990, 18, 301-304.

**Keegan, K., Collett, M.S.** 1986. Use of bacterial expression cloning to define the amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus. *J Virol.* 58(2):263-70.

**Keller, R., Hilton, T.D., Rios, H., Boedeker, E.C., Kaper, J.B.** 2010. Development of a live oral attaching and effacing *Escherichia coli* vaccine candidate using *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR as antigen vector. *Microb Pathog.*, 48(1):1-8.

**Kelso, A., Troutt, A.B., Maraskovsky, E., Gough, N.M., Morris, L., Pech, M.H., Thomson, J.A.** 1991. Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated *in vivo* and *in vitro*. *Immunol Rev.*, 123:85-114.

**Kitching R.P., Hammond J.M., Black D.N.** 1986. Studies on the major common precipitating antigen of capripox virus. *Journal of general virology*, 67 : 139-148

**Kitching R.P., Hammond J.M., Taylor W.P.** 1987. A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Research in veterinary science*, 42 : 53-60.

**Kohl, A., Clayton, R.F., Weber, F., Bridgen, A. & Randall, R.E.** 2003. Bunyamwera Virus Nonstructural Protein NSs Counteracts Interferon Regulatory Factor 3-Mediated Induction of Early Cell Death. *Journal of Virology*, 77: 14.

**Krauss, O., Hollinshead, R., Hollinshead, M. & Smith, G. L.** 2002. An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles. *J Gen Virol* 83, 2347-59.

**Kortekaas, J., Dekker, A., de Boer, S.M., Weerdmeester, K., Vloet, R.P., de Wit, A.A., Peeters, B.P., Moormann, R.J.** 2010a. Intramuscular inoculation of calves with an experimental Newcastle disease virus-based vector vaccine elicits neutralizing antibodies against Rift Valley fever virus. *Vaccine*, 28(11):2271-6.

**Kortekaas, J., de Boer, S.M., Kant, J., Vloet, R.P., Antonis, A.F., Moormann, R.J.** 2010b. Rift Valley fever virus immunity provided by a paramyxovirus vaccine vector. *Vaccine*, 28(27):4394-401

**Kul, O., , Kabakci, N., Atmaca, H.T., Ozkul, A.** 2007. Natural peste des petits ruminants virus infection: novel pathologic findings resembling other morbillivirus infections. *Vet Pathol*, 44(4): p. 479-86.

**Kwak, H., Mustafa, W., Speirs, K., Abdool, A. J., Paterson, Y. & Isaacs, S. N.** 2004. Improved protection conferred by vaccination with a recombinant vaccinia virus that incorporates a foreign antigen into the extracellular enveloped virion. *Virology* 322, 337-48.

**Kwiatek, O., Minet, C., Grillet, C., Hurard, C., Carlsson, E., Karimov, B., Albina, E., Diallo, A., Libeau, G.** 2007. *Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan*. *Journal of comparative pathology*, 136 (2-3): p. 111-9.

**Kyriakis, C.S., De Vleeschauwer, A., Barbé, F., Bublot, M., Van Reeth, K.** 2009. Safety, immunogenicity and efficacy of poxvirus-based vector vaccines expressing the

haemagglutinin gene of a highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in pigs. *Vaccine*, 27(16):2258-64.

**Lagerqvist, N., Näslund, J., Lundkvist, A., Bouloy, M., Ahlm, C., Bucht, G.** 2009. Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with Rift Valley Fever virus cDNA constructs. *Viol J.*, 7; 6:6.

**Lalani, A.S., Masters, J., Zeng, W.** 1999. Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science*, 286(5446):1968-1971.

**Lan, N.T., Yamaguchi, R., Kawabata, A., Uchida, K., Kai, K., Sugano, S., Tateyama, S.** 2006. Stability of canine distemper virus (CDV) after 20 passages in Vero- DST cells expressing the receptor protein for CDV. *Vet Microbiol*, 118(3-4): p. 177-88.

**Langeveld, J. P., J. I. Casal, A. D. Osterhaus, E. Cortes, R. de Swart, C. Vela, K. Dalsgaard, W. C. Puijk, W. M. Schaaper, and R. H. Melen.** 1994. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J. Virol.*, 68: 4506-4513.

**Law, M., Carter, G.C., Roberts, K.L., Hollinshead, M., Smith, G.L.** 2006. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *PNAS*, 103(15):5989-5994.

**Lefèvre, P.C.**, 2003. Peste bovine. Tec & doc ed. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes. Vol. 1, 285-305.

**Lefèvre, P.C., Gourreau, J.M.** 2003. Dermatose nodulaire contagieuse. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, pp. 429-443.

**Le Goff, C., Lamien, C.E., Fakhfakh, E., Chadeyras, A., Aba-Adulugba, E., Libeau, G., Tuppurainen, E., Wallace, D.B., Adam, T., Silber, R., Gulyaz, V., Madani, H., Caufour, P., Hammami, S., Diallo, A., Albina, E.** 2009. Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor: a host-range gene suitable for virus animal origin discrimination. *J Gen Virol.*, 90 (Pt 8):1967-77.

**Le May, N., Gaudiard, N., Billecocq, A. & Bouloy, M.** 2000. The N Terminus of Rift Valley Fever Virus Nucleoprotein is Essential for Dimerization. *Journal of Virology*, 79:18.

**Le May, N., Dubaele, S., De Santis, L.P., Billecocq, A., Bouloy, M. & Egly, J.M.** 2004. TFIIF Transcription Factor, a Target for the Rift Valley Hemorrhagic Fever Virus. *Cell*, 116.

**Le Roux, CA, Kubo, T., Grobbelaar, A.A., van Vuren, P.J., Weyer, J., Nel, L.H., Swanepoel, R., Morita, K., Paweska, J.T.** 2009. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol.*, 47(3):645-51.

**Li, S, Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Palese, P., Nussenzweig, R.S., Zavala, F.** 1993. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *PNAS*, 90: 5214–5218.

**Libeau, G., Diallo, A., Calvez, D. and Lefevre, PC.** 1992. A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest antibodies in cattle and small ruminants. *Vet Microbiol*, 31: p. 147-60.

**Libeau, G., Diallo, A., Colas, F., and Guerre, L.** 1994. Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet Rec*, 134: 300-304.

**Liszewski, M.K., T.W. Post, and J.P. Atkinson.** 1991. *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster.* *Ann. Rev Immunol*, 9: 431-55.

**Liu, X., Kremer, M., Broyles, S.S.** 2004. A natural vaccinia virus promoter with exceptional capacity to direct protein synthesis. *J Virol Methods*, 122(2):141-5.

**Liu, L., Celma, C.C., Roy, P.** 2008. Rift Valley fever virus structural proteins: expression, characterization and assembly of recombinant proteins. *Virol J.*, 18;5:82.

**Lorenzo, G., Martín-Folgar, R., Hevia, E., Boshra, H., Brun, A.** 2010. Protection against lethal Rift Valley fever virus (RVFV) infection in transgenic IFNAR(-/-) mice induced by different DNA vaccination regimens. *Vaccine*, 28(17):2937-44.

**Lorin, C., Mollet, L., Delebecque, F., Combredet, C., Hurtrel, B., Charneau, P., Brahic, M., Tangy, F.** 2004. A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *J Virol.*, 78(1):146-57.

**Lowen, A.C. & Elliott, R.M.** 2005. Mutational Analyses of the Nonconserved Sequences in the Bunyamwera Orthobunyavirus S Segment Untranslated Regions. *Journal of Virology*, 79:20.

**Machado, A.V., Naffakh, N., van der Werf, S., Escriou, N.** 2003. Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter. *Virology*, 313: 235–249.

**Mackett, M., Smith, G.L., Moss, B.** 1982. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7415–7419.

**Mackett M., Smith G.L., Moss B.** 1984. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *Journal of virology*, 857-864.

**Mackowiak, M., J. Maki, L. Motes-Kreimeyer, T. Harbin, and K. Van Kampen.** 1999. Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology. *Adv. Vet. Med.*, 41:571–583.

**McDermott, M.R., Graham, F.L., Hanke, T., Johnson, D.C.** 1989. Protection of mice against lethal challenge with herpes simplex virus by vaccination with an adenovirus vector expressing HSV glycoprotein B. *Virology*, 169:244–247.

**McDonald, R.A.S. & Morris J.P.A.** 1931. Pseudourticaria of cattle. In : Northern Rhodesian Dept. Animal Health, Annual Report 1930.

**McElroy, A.K., Albariño, C.G., Nichol, S.T.** 2009. Development of a RVFV ELISA that can distinguish infected from vaccinated animals. *Virol J.*, 6:125

**McFadden, G.** 2005. Poxvirus tropism. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(3):201-213

**McGinnes, L.W., Gravel, K.A., Finberg, R.W., Kurt-Jones, E.A., Massare, M.J., Smith, G., Schmidt, M.R., Morrison, T.G.** 2011. Assembly and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles containing the respiratory syncytial virus F and G proteins. *J Virol.* 85(1):366-77.

**McGrory, W.J., Bautista, D.S., Graham, F.L.** 1988. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology*, 163:614–617.

**McKeever, D. J., E. L. Taracha, W. I. Morrison, A. J. Musoke, and S. P. Morzaria.** 1999. Protective immune mechanisms against *Theileria parva*: evolution of vaccine development strategies. *Parasitology Today*, 15: 263–267.

**Mandell, R.B., Koukuntla, R., Mogler, L.J., Carzoli, A.K., Freiberg, A.N., Holbrook, M.R., Martin, B.K., Staplin, W.R., Vahanian, N.N., Link, C.J., Flick, R.** 2010. A replication-incompetent Rift Valley fever vaccine: chimeric virus-like particles protect mice and rats against lethal challenge. *Virology*. 397(1):187-98.

**Marechal, F., Ribeiro, N., Lafaye, M., Güell, A.** 2008. Satellite imaging and vector-borne diseases: the approach of the French National Space Agency (CNES). *Geospat Health*, 3: 1-5.

**Manchester, M., Eto, D.S., Valsamakis, A., Liton P.B., Fernandez-Muñoz, R, Rota, P.A., Bellini, W.J., Forthal, D.N, Oldstone, M.B.** 2000. Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol.*, 4(9):3967-74.

**Martinez, C., Pereira, P., Toribio, M.L., Marcos, M.A., Bandeira, A., de la Hera, A., Marquez, C., Cazenave, P.A., Coutinho, A.** 1988. The participation of B cells and antibodies in the selection and maintenance of T cell repertoires. *Immunol Rev.* 101: 191-215.

**Matsuoka, Y., Chen, S.Y. & Compans, R.W.** 1991. Bunyavirus Protein transport and Assembly. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 169: 161-179.

**Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr.** 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.*, 173: 89 – 97.

**Meegan, J.M.** 1979. The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-78. 1. Description of the epizootic and virological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 73(6): 618-23.

**Mendelman, P.M., Cordova, J., Cho, I.** 2001. Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live, cold adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults. *Vaccine*, 19:2221–2226.

**Mercer, J., Helenius, A.** 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 320 (5875): 531-535.

**Merchlinsky, M., Moss, B.** 1992. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by *in vitro* ligation : recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology*, 190 : 522-526.

**Merchlinsky, M., Eckert, D., Smith, E., Zauderer, M.** 1997. Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. *Virology*, 238 : 444-451.

**Michaud, V., Gil, P., Kwiatek, O., Prome, S., Dixon, L., Romero, L., Le Potier, M.F., Arias, M., Couacy-Hymann, E., Roger, F., Libeau, G., Albina, E.** 2007. Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *J Virol Methods*, 146 (1-2): 257-65.

**Minet, C., Kwiatek, O., Keita, D., Diallo, A., Libeau, G., Albina, E.** 2009. Infections à Morbillivirus chez les ruminants :la peste bovine en voie d'éradication et la peste des petits ruminants en extension vers le Nord. *Virologie*, 13 (2) : 103-13

**Minke, J.M., Siger, L., Karaca, K., Austgen, L., Gordy, P., Bowen, R., Renshaw, R.W., Loosmore, S., Audonnet, J.C., Nordgren, B.** 2004a. Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Archives of virology, Supplementum*, 18: 221-30.

**Minke, J. M., J. C. Audonnet, and L. Fischer.** 2004b. Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.*, 35: 425–443.

**Mir, M.A. & Panganiban, A.T.** 2004. Trimeric Hantavirus Nucleocapsid Protein Binds Specifically to the Viral RNA Panhandle. *Journal of Virology*, 78:15.

**Mir, M.A. & Panganiban, A.T.** 2006. The Bunyavirus Nucleocapsid Protein is an RNA Chaperone: Possible Roles in Viral RNA Panhandle Formation and Genome Replication. *RNA*, 12.

**Miyahira, Y., García-Sastre, A., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Murata, K., Tsuji, M., Palese, P., Esteban, M., Zavala, F., Nussenzweig, R.S.** 1998. Recombinant viruses

expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8<sup>+</sup> responses in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:3954–3959.

**Miyazawa, N., Leopold, P.L., Hackett, N.R., Ferris, B., Worgall, S., Falck- Pedersen, E., Crystal, R.G.** 1999. Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J Virol.*, 73: 6056–6065.

**Morrill, J.C., McClain, D.J.** 1996. The viruses, In, *The Viruses*, Fraenkel-Conrat, H., Wagner, R.R Editors, Plenum Press: New York and London, 281-293.

**Morrill, J.C., Mebus, C.A., Peters, C.J.** 1997a. Safety and efficacy of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in cattle. *Am J Vet Res.*, 58(10):1104-9.

**Morrill, J.C., Mebus, C.A., Peters, C.J.** 1997b. Safety of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in fetal and neonatal bovinds. *Am J Vet Res.*, 8(10):1110-4.

**Morrill, J.C., Peters, C.J.** 2003. Pathogenicity and neurovirulence of a mutagen-attenuated Rift Valley fever vaccine in rhesus monkeys. *Vaccine*, 21(21-22):2994-3002.

**Mortensen, S., R. Stryhn, A. Boklund, K. D. Stark, J. Christensen, and P. Willeberg.** 2002. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev. Vet. Med.*, 53:83–101.

**Moss B.** 1992. Poxvirus vectors: cytoplasmic expression of transferred genes. *Current opinion in genetics and development*, 3(1) : 86-90.

**Moss, B.** 1996. Poxviridae: the viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields virology*. New York: Lippincott Raven Press, 2637-2671.

**Moss, B.** 2001. Poxviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, pp. 2849-2883. Edited by D. M. K. a. P. M. howley. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

**Moss, B.** 2006. Poxvirus entry and membrane fusion, *Virology* 344, 48–54.

**Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L.** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.*, 136(7):2348-57.

**Mosmann, T.R., Coffman, R.L.** 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.*, 7:145-73.

**Moutailler, S., Krida, G., Schaffner, F., Vazeille, M., Failloux, A.B.** 2008. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8 : 749-53.

**Muller, R., Saluzzo, J.F., Lopez, N., Dreier, T., Turell, M., Smith, J., Bouloy, M.** 1995. Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am J Trop Med Hyg.*, 53(4):405-11.

**Murphy, F.A., Gibbs, E.P., Horzinek, M.C., Studdert, M.J.** 1999. *Veterinary virology*. Academic Press.

**Mwangi, W., Brown W.C., Lewin, H.A., Howard, C.J., Hope, J.C., Baszler, T.V., Caplazi, P., Abbott, J., Palmer, G.H.** 2002. DNA-encoded foetal liver tyrosine kinase 3 ligand and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor increase dendritic cell recruitment to the inoculation site and enhance antigen-specific CD4+ T cell responses induced by DNA vaccination of outbred animals. *Journal of immunology*, 169 (7) : 3837-3846.

**Nash, P., Barrett, J., Cao, J.X., et al.** 1999. Immunomodulation by viruses: the myxoma virus story. *Immunol. Rev.*, 168:103-120.

**Näslund, J., Lagerqvist, N., Lundkvist, A., Evander, M., Ahlm, C., Bucht, G.** 2008. Kinetics of Rift Valley Fever Virus in experimentally infected mice using quantitative real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, 151(2):277-82.

**Näslund, J., Lagerqvist, N., Habjan, M., Lundkvist, A., Evander, M., Ahlm, C., Weber, F., Bucht, G.** 2009. Vaccination with virus-like particles protects mice from lethal infection of Rift Valley Fever Virus. *Virology*, 385 : 409-15.

**Neumann, G., Whitt, M.A., Kawaoka, Y.** 2002. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA—what have we learned? *J Gen Virol.*, 83: 2635–2662.

**Niklasson, B., Grandien, M., Peters, C.J., Gargan, T.P. 2nd.** 1983. Detection of Rift Valley fever virus antigen by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.*, 17(6):1026-31.

**Njenga, M.K., Paweska, J., Wanjala, R., Rao, C.Y., Weiner, M., Omballa, V., Luman, E.T., Mutonga, D., Sharif, S., Panning, M., Drosten, C., Feikin, D.R., Breiman, R.F.** 2009. Using field quantitative real-time PCR test to rapidly identify highly viremic rift valley fever cases. *J Clin Microbiol*, 47 : 166-71.

**OIE.** 2011. DZA 21-03-11 OIE Alert - Alerta - Alerte - Peste des petits ruminants - Peste des petits ruminants - Peste de pequeños rumiantes

**Ojeda, J.J., Orozco, L., Flores, R., Rojas, C., Figueroa, J.V., Alvarez, J.A.** 2010. Validation of an attenuated live vaccine against babesiosis in native cattle in an endemic area. *Transbound Emerg Dis.*, 57(1-2):84-6.



**Ozkul, A., Akca, Y., Alkan, F., Barrett, T., Karaoglu, T., Dagalp, S.B., Anderson, J., Yesilbag, K., Cokcaliskan, C., Gencay, A., Burgu, I.** 2002. *Prevalence, distribution, and host range of Peste des petits ruminants virus, Turkey. Emerg Infect Dis*, **8** (7): 708-12.

**Overby, A.K., Pettersson, R.F., Grunewald, K. & Huiskonen, J.T.** 2008. Insights into Bunyavirus Architecture from Electron Cryotomography of Uukuniemi Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:7.

**Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chrétien I, Abrams J, de Vries J, Spits H.** 1988. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell clones. *J Immunol*. 141(3):849-55.

**Panicali, D., Paoletti, E.** 1982. Construction of poxviruses as cloning vectors : insertion of thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** : 4927- 4931.

**Panicali, D., Grzeleccki, A., Huang, C.** 1986. Vaccinia virus vectors utilizing the beta-galactosidase assay for rapid selection of recombinant viruses and measurement of gene expression. *Gene*, 47 : 193-199.

**Paoletti, E.** 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11349–11353.

**Pastoret, P.P., Vanderplasschen, A.** 2003. Poxviruses as vaccine vectors. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 26: 343–355.

**Pastoret, P.P.** 2009. Emerging diseases, zoonoses and vaccines to control them. *Vaccine*, 27: 6435-6438

**Paweska, J.T., Mortimer, E., Leman, P.A., Swanepoel, R.** 2005. An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. *J Virol Methods*, 127 : 10-8.

**Paweska, J.T., Jansen van Vuren, P., Swanepoel, R.** 2007. Validation of an indirect ELISA based on a recombinant nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus for the detection of IgG antibody in humans. *J Virol Methods*, 46(1-2):119-24.

**Paweska, J.T., van Vuren, P.J., Kemp, A., Buss, P., Bengis, R.G., Gakuya, F., Breiman, R.F., Njenga, M.K., Swanepoel, R.** 2008. Recombinant nucleocapsid-based ELISA for detection of IgG antibody to Rift Valley fever virus in African buffalo. *Vet Microbiol.*, 127(1-2): 21-8.

**Perkus, M.E., Piccini, A., Lipinskas, B.R., Paoletti, E.** 1985. Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. *Science*, 229 : 981-984.

**Perkus, M.E., Goebel, S.J., Davis, S.W., Johnson, G.P., Norton, E.K., Paoletti, E.** 1991. Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology*, 180 : 406-410.

**Perkus, M.E., Tartaglia, J., Paoletti, E.** 1995. Poxvirus-bases vaccine candidates for cancer, AIDS, and others infectious diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 58 : 1-13.

**Perrin, A., Albina, E., Bréard, E., Sailleau, C., Promé, S., Grillet, C., Kwiatek, O., Russo, P., Thiéry, R., Zientara, S., Cêtre-Sossah, C.** 2007. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*, 25:6774-6783.

**Peters, C.J., Ennis, W.H., Turell, M.J., Niklasson, B.** 1989. Rapid detection of Rift Valley fever antigen in the serum of infected lambs. *Res Virol.*, 140(1):43-6.

**Peters, C. and Linthicum, K.** 1994. Rift Valley Fever. In: Handbook series in Zoonoses, sectionB: viral zoonosoe second edition, Beron GW, Steele JH Editors, CRC Press:Boca Raton, 125-138.

**Pettersson, R.F. & Melin, L.** 1996. Synthesis, assembly, and intracellular transport of Bunyaviridae membrane proteins. In Elliott RM (ed.), The Bunyaviridae. Plenum Press, New York, N.Y.

**Petit, F., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Fassy, F., Boucraut-Baralon, C., Milon, A.** 1996. Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Virol.*, 70(9):5860-6.

**Peyrefitte, C.N., Boubis, L., Coudrier, D., Bouloy, M., Grandadam, M., Tolou, H.J., et al.** 2008. Real-time reversetranscription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of rift valley fever virus. *J Clin Microbiol.*, 46: 3653-9.

**Piccini A., Perkus M.E., Paoletti E.** Vaccinia virus as an expression vector. *Methods in enzymology*, 1987, 153 : 545-563.

**Pinto, A.R., Fitzgerald, J.C., Giles-Davis, W., Gao, G.P., Wilson, J.M., Ertl, H.C.** 2003. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. *J Immunol*, 171:6774–6779.

**Pittman, P.R., Liu, C.T., Cannon, T.L., Makuch, R.S., Mangiafico, J.A., Gibbs, P.H.** 1999. Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience. *Vaccine*, 18 : 181-9.

**Prevec, L., Campbell, J.B., Christie, B.S., Belbeck, L., Graham, F.L.** 1990. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *J Infect Dis*, 161:27–30.

**Prevec, L., Schneider, M., Rosenthal, K.L., Belbeck, L.W., Derbyshire, J.B., Graham, F.L.** 1989. Use of human adenovirus-based vectors for antigen expression in animals. *J Gen Virol* 70 (Pt 2):429–434.

**ProMED-mail** post .RIFT VALLEY FEVER, LIVESTOCK, HUMAN – MAURITANIA.  
<<http://www.promedmail.org>>Date: Thu 2 Dec 2010

**Provost, A., Perreau, P., Bréard, A., Le Goff, C.** 1987. *Revue Scientifique et Technique OIE*, 6 : 564-624.

**Pugachev, K.V., Tzeng, Wen-Pin, Frey, Teryl, K..** 2000. Development of a Rubella Virus Vaccine Expression Vector: Use of a Picornavirus Internal Ribosome Entry Site Increases Stability of Expression. *Journal of Virology*, 74 (22):10811-10815.

**Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P., Baylis, M.** 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature: reviews in microbiology*, 3(2) : 171-181.

**Pushko, P., Geisbert, J., Parker, M., Jahrling, P., Smith, J..** 2001. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *Journal of Virology*, 75: 11677–11685.

**Quan, F.S., Vunnava, A., Compans, R.W., Kang, S.M.** 2010. Virus-like particle vaccine protects against 2009 H1N1 pandemic influenza virus in mice. *PLoS One*, 5(2):e9161.

**Randall, R., Gibbs, C.J. Jr., Aulisio, C.G., Binn, L.N., Harrison, V.R.** 1962. The development of a formalin-killed Rift Valley fever virus vaccine for use in man. *J Immunol.*, 89:660-71.

**Randall, RE, Binn, L.N., Harrison, V.R.** 1964. Immunization against RVF virus. Studies on the immunogenicity of lyophilized formalin- inactivated vaccine. *J Immunol.*, 93:293-9.

**Randall, RE & Goodbourn, S.** 2008. Interferons and Viruses: an Interplay Between Induction, Signaling, 80. Antiviral Responses and Viral Countermeasures. *Journal of General Virology* 89.

**Ratovonjato, J., Olive, M.M., Tantely, L.M., Andrianaivolambo, L., Tata, E., Razainirina, J., Jeanmaire, E., Reynes, J.M., Elissa, N.** 2010. Detection, Isolation, and Genetic Characterization of Rift Valley Fever Virus from *Anopheles (Anopheles) coustani*, *Anopheles (Anopheles) squamosus*, and *Culex (Culex) antennatus* of the Haute Matsiatra Region, Madagascar. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Oct 28. [Epub ahead of print].

**Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Peters, C.J. & Compans, R.W.** 1997. Role of Actin Microfilaments in Black Creek Canal Virus Morphogenesis. *Journal of Virology*, 72:4 .

**Robert-Guroff, M.** 2007. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol.*, 18(6):546-56.

**Roberts, K.L., Smith, G.L.** 2008. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in Microbiology*, 16(10):472-479.

**Romero, C.H., Barrett, T., Evans, S.A., Kitching, R.P., Gershon, P.D., Bostock, C., Black, D.N.** 1993. Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*, 11(7):737-42.

**Romero C.H., Barrett T., Chamberlain R.W., Kitching R.P., Fleming M., Black D.N.** 1994. Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology*, 204(1) : 425-429.

**Rosenberg, S. A., J. C. Yang, R. M. Sherry, P. Hwu, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, N. P. Restifo, L. R. Haworth, C. A. Seipp, L. J. Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, and D. E. White.** 2003. Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanomamelanocyte antigen. *Human Gene Therapy*, 14:709-714.

**Rossiter, P.B., D.M. Jessett, and W.P. Taylor.** 1985. Microneutralisation systems for use with different strains of peste des petits ruminants virus and rinderpest virus. *Trop Anim Health Prod*, 17(2): p. 75-81.

**Roy, P., Urakawa, T., Van Dijk, A.A., Erasmus, B.J.** 1990. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *J Virol.*, 64(5):1998-2003.

**Roy, P., Bishop, D.H., LeBlois, H., Erasmus, B.J.** 1994. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine*, 12(9):805-11.

**Sall, A.A., Macondo, E.A., Sène, O.K., Diagne, M., Sylla, R., Mondo, M., Girault, L., Marrama, L., Spiegel, A., Diallo, M., Bouloy, M., Mathiot, C.** 2002. Use of reverse transcriptase PCR in early diagnosis of Rift Valley fever. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(3):713-5.

**Sall, A.A., Thonnon, J., Sene, O.K., Fall, A., Ndiaye, M., Baudez, B., Mathiot, C., Bouloy, M.** 2001. Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J Virol Methods*, 91(1):85-92.

**Saluzzo, J.F., Smith, J.F.** 1990. Use of reassortant viruses to map attenuating and temperature-sensitive mutations of the Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. *Vaccine*, 8(4):369-75.

**Sanchez-Puig J.M., Blasco R.** 2000. Puromycin resistance (pac) gene as a selectable marker in vaccinia virus. *Gene*, 57-65.

**Sang, R., Kioko, E., Lutomiah, J., Warigia, M., Ochieng, C., O'Guinn, M., Lee, J.S., Koka, H., Godsey, M., Hoel, D., Hanafi, H., Miller, B., Schnabel, D., Breiman, R.F., Richardson, J.** 2010. Rift Valley fever virus epidemic in Kenya, 2006/2007: the entomologic investigations. *Am J Trop Med Hyg.* 83(2 Suppl): 28-37.

**Sanz-Alvarez, J., Diallo, A., De LaRocque, S., Pinto, J., Thevenet, S., Lubroth, J.** 2008. Peste des petits ruminants (PPR) in Morocco. *EMPRES Watch* August.

**Sarkar, J., Sreenivasa, B.P., Singh, R.P., Dhar, P., Bandyopadhyay, S.K.** 2003. Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. *Vaccine*, 21(32): 4728-35.

**Scheifflinger, F., Dorner, F., Falkener, F.G.** 1992. Construction of chimeric vaccinia viruses by molecular cloning and packaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89** : 9977-9981.

**Schlesinger, S., and T. W. Dubensky.** 1999. Alphavirus vectors for gene expression and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 434–439.

**Schmaljohn, C.S., Parker, M.D., Ennis, W.H., Dalrymple, J.M., Collett, M.S., Slizich, J.A., Schmaljohn, A.L.** 1989. Baculovirus expression of the M genome segment of Rift Valley fever virus and examination of antigenic and immunogenic properties of the expressed proteins. *Virology*, 170, Issue 1, 184-192.

**Schmaljohn, C.S. & Hooper, J.W.** 1996. *Bunyaviridae: the Viruses and their Replication*. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1, third ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.

**Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M.** 1994. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J. Virol.*, 68(1):130-147.

**Schnell, M.J., Mebatsion, T., Conzelmann, K.K.** 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* **13** : 4195-4203.

**Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R.,** 2003. Poxviruses and immune evasion. *Annu. Rev. Immunol.*, 21:377-423.

**Shirley, M. W., A. L. Smith, and F. M. Tomley.** 2005. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv. Parasitol.*, 60:285–330.

**Shiver, J. W., T. M. Fu, L. Chen, D. R. Casimiro, M. E. Davies, R. K. Evans, Z. Q. Zhang, A. J. Simon, W. L. Triglona, S. A. Dubey, L. Huang, V. A. Harris, R. S. Long, X. Liang, L. Handt, W. A. Schleif, L. Zhu, D. C. Freed, N. V. Persaud, L. Guan, K. S. Punt, A. Tang, M. Chen, K. A. Wilson, K. B. Collins, G. J. Heidecker, V. R. Fernandez, H. C. Perry, J. G. Joyce, K. M. Grimm, J. C. Cook, P. M. Keller, D. S. Kresock, H. Mach, R. D. Troutman, L. A. Isopi, D. M. Williams, Z. Xu, K. E. Bohannon, D. B. Volkin, D. C. Montefiori, A. Miura, G. R. Krivulka, M. A. Lifton, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, N. L. Letvin, M. J. Caulfield, A. J. Bett, R. Youil, D. C. Kaslow, and E. A. Emini.** 2002. Replication in competent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, **415**:331-335.

**Short, J. J., Pereboev, A.V., Kawakami, Y, Vasu, C, Holterman, M.J, Curiel, DT.** 2004. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology*, 322: 349 – 359.

**Siddiqui, M.A., Perry, C.M.** 2006. Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Drugs*, 66(9):1263-71; discussion 1272-3.

**Singh, R.P., De, U.K., Pandey, K.D.** 2009. Virological and antigenic characterization of two Peste des Petits Ruminants (PPR) vaccine viruses of Indian origin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Feb 4.

**Sissoko, D., Giry, C., Gabrie, P., Tarantola, A., Pettinelli, F., Collet, L., D'Ortenzio, E., Renault, P., Pierre, V.** 2009. Rift Valley fever, Mayotte, 2007-2008. *Emerg Infect Dis.*, 15(4):568-70.

**Smith, G.L., Mackett, M., Moss, B.** 1983. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature*, 302:490-495.

**Smith, G.L., Mackett, M., Moss, B.** 1984. Recombinant vaccinia viruses as new live vaccines. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 2 : 383-407.

**Smith, E.S., Mandokhot, A., Evans, E.E.** 2001. Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells : application to identifying tumor antigens. *Nature Med.*, 7: 967-972.

**Smith, G.L., Vanderplasschen, A., Law, M.** 2002. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.*, 83(Pt 12):2915-2931.

**Smithburn K.C.** 1949a. Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br J Exp Pathol.*, 30 (1):1-16.

**Smithburn, K.C., Haddow, A.J., Lumsden, W.H.R.** 1949b. Rift valley fever transmission virus by mosquitoes. *Br.J.Exp.Pathol.*, 30 : 35-47.

**Sodeik, B., Krijnse-Locker, J.** 2002. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? *Trends Microbiol.*, 10(1):15-24.

**Soi, R.K, Rurangirwa, F.R., McGuire, T.C., Rwambo, P.M., DeMartini, J.C., Crawford, T.B.** 2010. Protection of sheep against Rift Valley fever virus and sheep poxvirus with a recombinant capripoxvirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 17(12):1842-9.

**Sow, A., Ouattara, L., Compaoré, Z., Doulkom, B.R., Paré, M., Poda, G., Nyambré, J.** 2008. Prévalence sérologique de la peste des petits ruminants dans la province du Soum au nord du Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* 61 (1) : 5-9

**Spadaccini, A., Virnik, K., Ni, Y., Prutzman, K., Berkower, I.** 2010. Stable expression of a foreign protein by a replication-competent rubella viral vector. *Vaccine*, 28(5):1181-7.

**Spik, K, Shurtleff, A., McElroy, A.K., Guttieri, M.C., Hooper, J.W., SchmalJohn, C.** 2006. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne

encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 22;24(21):4657-66.

**Stephenne, J.** 1988. Recombinant versus plasma-derived hepatitis B vaccines: issues of safety, immunogenicity and cost-effectiveness. *Vaccine*, 1988, 6(4):299-303.

**Stewart, A.J., Devlin P.M.** 2006. The history of the smallpox vaccine. *The Journal of infection*, 52(5):329-34.

**Stewart, M., Bhatia, Y., Athmaran, T.N., Noad, R., Gastaldi, C., Dubois, E., Russo, P., Thiéry, R., Sailleau, C., Bréard, E., Zientara, S., Roy, P.** 2010. Validation of a novel approach for the rapid production of immunogenic virus-like particles for bluetongue virus. *Vaccine*, 28(17):3047-54.

**Stittelaar, K. J., L. S. Wyatt, R. L. de Swart, H. W. Vos, J. Groen, G. van Amerongen, R. S. van Binnendijk, S. Rozenblatt, B. Moss, and A. D. Osterhaus.** 2000. Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies. *J. Virol.*, 74:4236-4243.

**Sullivan, N. J., A. Sanchez, P. E. Rollin, Z. Y. Yang, and G. J. Nabel.** 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*, 408: 605-609.

**Suzich, J.A. Torborg Kakach L. and Collett, M.** 1990. Expression Strategy of a Phlebovirus: Biogenesis of Proteins from the Rift Valley Fever Virus M Segment. *Journal of Virology*, 64 (4), 1549-1555

**Swanepoel, B. & Coetzer, A.** 1996 . Rift Valley fever. In : Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa. JAW Coetzer GR Thomson & RC Tustin (Eds). Oxford University Press, Tome 1: 688-717.

**Tangney, M., Gahan, C.G.** 2010. *Listeria monocytogenes* as a vector for anti-cancer therapies. *Curr Gene Ther.* , 10(1):46-55. Review.

**Tartaglia, J., O. Jarrett, J. C. Neil, P. Desmettre, and E. Paoletti.** 1993. Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J. Virol.* **67**:2370-2375.

**Tatsuo, H., N. Ono, and Y. Yanagi.** 2001. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol*, 75(13): p. 5842-50.

**Tatsuo, H. and Y. Yanagi,** 2002. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol*, 46(3): p. 135-42.

**Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A.** 1991. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk-) deficient and tk+ phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *Journal of general virology*, 72 : 125-130.

**Taylor, J., B. Meignier, J. Tartaglia, B. Languet, J. VanderHoeven, G. Franchini, C. Trimarchi, and E. Paoletti.** 1995. Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species. *Vaccine*, 13:539-549.

**Tesh, R.B.** 1988. The Genus Phlebovirus and its vectors. *Annual Review of Entomology*, 33.

**Timiryasova, T.M., Chen, B., Fodor, N., Fodor, I.** 2001. Construction of recombinant vaccinia viruses using PUV-Inactivated Virus as a helper. *Biotechniques*, 31 : 534-540.

**Tine, J.A., Lanar, D.E., Smith, D.M.** 1996. NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immun.*, 64 : 3833-3844.

**Tokuyasu K.T.** 1980. Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem. J.* 12: 381-403

**Tolou, H., Nicoli, J., Chastel, C.** 2002. Viral evolution and emerging viral infections : what future for the viruses? A theoretical evaluation based on informational spaces and quasispecies. *Virus Genes*, 24 : 267-74.

**Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., Kern, H.** 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell Biol.*, 60(1):163-178.

**Townsley, A.C., Weisberg, A.S., Wagenaar, T.R., Moss, B.** 2006. Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J. Virol.*, 80(18):8899-8908.

**Tsuji, M., C. C. Bergmann, Y. Takita-Sonoda, K. Murata, E. G. Rodrigues, R. S. Nussenzweig, and F. Zavala.** 1998. Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *Journal of Virology*, 72:6907-6910.

**Tufan, M.,** 2006. *Animal health authorities and transboundary animal diseases in Turkey.* J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 53 Suppl 1: p. 35-7.

**Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G.F., Rock, D.L.** 2001. Genome of lumpy skin disease virus. *J Virol.*, 75(15):7122-30.

**Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J.H., Sandybaev, N.T., Kerembekova, U.Z., Zaitsev, V.L., Kutish, G.F., Rock, D.L.** 2002. The genomes of sheepox and goatpox viruses. *J Virol.*, 76(12):6054-61.

**Turell, M.J., Gargan, T.P. 2nd, Bailey CL.** 1984. Replication and dissemination of Rift Valley fever virus in *Culex pipiens*. *Am J Trop Med Hyg.*, 33(1):176-81.



**Turell, M.J., Dohm, D.J., Mores, C.N., Terracina, L., Walette, D.L. Jr, Hribar, L.J.** 2008a. Potential for North American mosquitoes to transmit Rift Valley fever virus. *J Am Mosq Control Association*, 24 : 502-7.

**Turell, M.J., Linthicum, K.J., Patrican, L.A., Davies, F.G., Kairo, A., Bailey, C.L.** 2008b. Vector competence of selected African mosquito (Diptera: Culicidae) species for Rift Valley fever virus. *J Med Entomol.*, 45(1):102-8.

**Turnbull, P.C.** 1991. Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine*, 9(8):533-9. Review.

**Turner, P.C., Sancho, M.C., Thoennes, S.R., Caputo, A., Bleackley, R.C., Moyer R.W.** 1999. Myxoma virus Serp2 is a weak inhibitor of granzyme B and interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme in vitro and unlike CrmA cannot block apoptosis in cowpox virus-infected cells. *Journal of Virology*, 73(8):6394-6404.

**Van Vuren, J., Potgieter, P., Paweska, A.C., van Dijk, J.T.** 2007. Preparation and evaluation of a recombinant Rift Valley fever virus N protein for the detection of IgG and IgM antibodies in humans and animals by indirect ELISA. *J Virol Methods*, 140(1-2):106-14.

**Van Vuren, J., Paweska, J.T.** 2009. Laboratory safe detection of nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus in human and animal specimens by a sandwich ELISA. *J Virol Methods*, 157 : 15-24.

**Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R.B., Smith, G.L.** 1998. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 23; 95(13):7544-7549.

**Verardi, P.H., Aziz, F.H., Ahmad, S., Jones, L.A., Beyene, B., Ngotho, R.N., Wamwayi, H.M., Yesus, M.G., Egziabher, B.G., Yilma, T.D.** 2002. Long-term sterilizing immunity to rinderpest in cattle vaccinated with a recombinant vaccinia virus expressing high levels of the fusion and hemagglutinin glycoproteins. *Journal of Virology*, 76(2):484-91.

**Wade-Evans, A.M., Romero, C.H., Mellor, P., Takamatsu, H., Anderson, J., Thevasagayam, J., Fleming, M.J., Mertens, P.P., Black, D.N.** 1996. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology*, 220(1) : 227-231.

**Wallace D.B., Viljoen G.J.** 2002. Importance of thymidine kinase activity for normal growth of lumpy skin disease virus (SA-Neethling). *Archives of virology*, 147(3) : 659-663.

**Wallace, D.B., Viljoen, G.J.** 2005. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, 23(23):3061-7.

**Wallace, D.B., Ellis, C.E, Espach, A, Smith, S.J., Greyling, R.R., Viljoen, G.J.** 2006. Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. *Vaccine*, 24(49-50):7181-9.

**Wallace, D.B., Weyer, J., Nel, L.H., Viljoen, G.J.** 2007. Improved method for the generation and selection of homogeneous lumpy skin disease virus (SA-Neethling) recombinants. *Journal of virological methods*, doi:10.1016/j.jviromet.2007.06.004.

**Wang, F., Ma, Y., Barrett, J.W.** 2004. Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol.*, 5(12):1266-74.

**Wohlsein, P., Wamwayi ,H.M., Trautwein, G., Pohlenz, J., Liess, B., Barrett, T.** 1995. Pathomorphological and immunohistological findings in cattle experimentally infected with rinderpest virus isolates of different pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 4(2-4): p. 141-9.

**Won, S., Ikegami, T., Peters, C.J. & Makino, S.** 2007. NSm Protein of Rift Valley Fever Suppresses Virus- Induced Apoptosis. *Journal of Virology*, 81:24.

**Xin, K. Q., T. Ooki, H. Mizukami, K. Hamajima, K. Okudela, K. Hashimoto, Y. Kojima, N. Jounai, Y. Kumamoto, S. Sasaki, D. Klinman, K. Ozawa, and K. Okuda.** 2002. Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses. *Human Gene Therapy*, 13:1571-1581

**Yamanouchi, K., Barrett, T.** 1994. Progress in the development of a heat-stable recombinant rinderpest vaccine using an attenuated vaccinia virus vector. *Rev Sci Tech.*, 13(3):721-35. Review.

**Yeruham, I., Perl, S., Nyska, A., Abraham, A., Davidson, M., Haymovitch, M., Zamir, O., Grinstein, H.** 1994. Adverse reactions in cattle to a capripox vaccine. *The veterinary record*, 135(1: 330-332.4) .

**Zavala, F., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Nussenzweig, R.S., Esteban, M.** 2001. A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8 (+) T cells. *Virology*, 280(2):155-9.

**Zhu, Y., Rota, P., Wyatt, L., Tamin, A., Rozenblatt, S., Lerche, N., Moss, B., Bellini, W., McChesney, M.** 2000. Evaluation of recombinant vaccinia virus--measles vaccines in infant rhesus macaques with preexisting measles antibody. *Virology*, 276(1):202-13.

**Zuniga, M.C.** 2002. A pox on thee! Manipulation of the host immune system by myxoma virus and implications for viral-host co-adaptation. *Virus Research*, 88(1-2):17-33.

## **ANNEXES**

Noms	Gènes	Séquences (5'-3')
Chemo 02Bis	Chemokine RIL8	TTTTTTATTTTTATCCAATGCTAATACT
Chemo 09	Chemokine RIL8	TTAAGTAAAGCATAACTCCAACAAAA
CHEMO 2231F	Chemokine RIL8	GCTATGTTTTACTTTGTTGG
HP56	H-PPR	CCTATAGAGTTGTCCAGC
HP46	H-PPR	CGCACAAAGGGAAGGATCA
HP47	H-PPR	CTGATGCCGACTTCATCACC
TK9	TK	TCCTATAATATACTAAATAACAAATAAC
TK10	TK	CAACAGATTATATTTTCCTTACCC
SpeINSmG2F	NSmG2G1-177	GGAAGTAGTACCATGCCGAGGA
SpeINSmG2G1F	NSmG2G1	GGGG <b>ACTAGT</b> ATGTATGTTTTATTAAC
G1RiftR	NSmG2G1	CCCTCTTAGTCTGACCAGAGTCC
NotIG2R	NSmG2G1	AAGGAAAAAG <b>CGGGCGGCT</b> CAATGCTGATGCATATGAGACAA
SpeIG1F	NSmG2G1	GGAAGTAGTATGGTTCAGAACTGATTCAGGCAA
SpeIG1R	NSmG2G1	GGGAG <b>ACTAGT</b> CTATGAGGCCTTCTTA
NotIG1R	NSmG2G1	TATCAAAAT <b>CGCGGCGCT</b> ATGAGGCCTTCTTAGTGG
PIL1G2RiftF	NSmG2G1	TATTTAAAGTTGTTTGGTGAACCTAAATGATGTATGTTTTATTAACAATTCTAATCTCGGT
PIL1NSmRiftFfinal	NSmG2G1	TATTTAAAGTTGTTTGGTGAACCTAAATGATGTATGTTTTATTAACAATTCTAATCTCGGT
PII1RiftG2Ffinal	NSmG2G1	TATTTAAAGTTGTTTGGTGAACCTAAATGATGGAAGACCCCATCTCAGAA
G2/G1 RIFT -F	NSmG2G1	ACCAGGGAAGGGGACAACTA
G2/G1 RIFT -R	NSmG2G1	CCCTCTTAGTCTGACCAGAGTCC
pKSXhoIMDF	pKSCATPSGPT	GAGTGTCCCGCCAGCCTCGAGACATGGTCGAGC
pKSXhoIMDR	pKSCATPSGPT	GCTCGACGATGTCTCGAGGCTGGCTGGGACACTC
G418F	G418	CTCGAGCTCGAGATGGGATCGGCCATTGAACA
G418R	G418	CCCGGGCCCGGGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG

**Annexe 1 : Liste des amorces utilisées**

**Annexe 2 :** Article E. Ayari-Fakhfakh, A. Ghram, A. Bouattour, I. Larbi, L. Gribâa-Dridi, O. Kwiatak b, M. Bouloy, G. Libeau, Emmanuel Albina, Catherine Cêtre-Sossah. 2011. First serological investigation of peste-des-petits-ruminants and Rift Valley fever in Tunisia. *The Veterinary Journal* 187, 402–404.

The Veterinary Journal 187 (2011) 402–404



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)



## Short Communication

# First serological investigation of peste-des-petits-ruminants and Rift Valley fever in Tunisia

Emna Ayari-Fakhfakh<sup>a</sup>, Abdeljelil Ghram<sup>a</sup>, Ali Bouattour<sup>a</sup>, Imen Larbi<sup>a</sup>, Latifa Gribâa-Dridi<sup>a</sup>, Olivier Kwiatak<sup>b</sup>, Michèle Bouloy<sup>c</sup>, Geneviève Libeau<sup>b</sup>, Emmanuel Albina<sup>b</sup>, Catherine Cêtre-Sossah<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut Pasteur de Tunis 13, Place Pasteur, B.P. 74, 1002 Tunis Belvédère, Tunisia

<sup>b</sup> CIRAD, UMR Contrôle des Maladies, Montpellier F-34398, France

<sup>c</sup> Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France

## ARTICLE INFO

Article history:  
Accepted 16 January 2010

Keywords:  
Peste-des-petits-ruminants  
Rift Valley fever  
Vectors  
Tunisia

## ABSTRACT

This study, carried out between September 2006 and January 2007, is the first cross-sectional serological investigation of peste-des-petits-ruminants (PPR) and Rift Valley fever (RVF) in Tunisia. The objective was to assess the potential need to develop a dual, recombinant PPR–RVF vaccine and how such a vaccine might be utilised in Tunisia. An overall PPR seroprevalence of 7.45% was determined, a finding supported by the high specificity (99.4%) and sensitivity (94.5%) of the ELISA used. On assessment of the diversity and density of mosquitoes in the sampling area, four species of RVF-vectors of the genus *Aedes* and *Culex* were identified. However, no serological evidence of RVF was found despite the use of a highly sensitive ELISA (99–100%). Larger scale investigations are underway to confirm these findings and the continuation of the emergency vaccination program against these two diseases remains valid.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The ongoing, un-regulated movement of livestock between Algeria and Libya poses a risk to the health of animals in intervening Tunisia, in particular to diseases such as peste-des-petits-ruminants (PPR) and Rift Valley fever (RVF). In consequence, the development and use of a dual, recombinant capripox vector vaccine against these diseases has been proposed (Faye et al., 2007). To determine the current prevalence of these diseases in Tunisia a cross-sectional serological study was conducted in six regions considered high-risk areas for PPR and RVF because of their ecology and livestock density. A total of 610 serum samples were randomly collected from animals near water sources between September 2006 and January 2007 (Table 1). Serological analysis was carried out at the Pasteur Institutes at Tunis and Paris and at CIRAD Montpellier, France.

To assess the seroprevalence of PPR, blood samples from 263 sheep and 119 goats were analysed by competitive ELISA as previously described (Libeau et al., 1995). In addition, 28 lung samples harvested from slaughtered animals (25 sheep; 3 goats) from different regions were tested using a PPR virus-specific RT-PCR (Couacy-Hymann et al., 2002). All sera were also analysed using a RVF competitive ELISA as previously described (Paweska et al., 2005). In order to assess the extent and prevalence of potential mosquito vectors, larvae from potential breeding sites in each region (the

main wetland areas), were collected and identified. Statistical analysis was carried out using Winepiscscope software (De Blas et al., 2000).

The overall apparent seroprevalence of PPR was 7.6% (95% confidence interval, CI, 4.9–10.1), a finding supported by the high specificity (99.4%) and sensitivity (94.5%) of the ELISA (Libeau et al., 1995). The Kairouan (95%, CI 8.7–22.3) and Kebili (95%, CI 3.1–20.9) regions had the highest seroprevalence, a finding that was not unexpected given the abundant animal movement within these areas (Table 2). The difference in seroprevalence between goats (11.8%) and sheep (5.7%) was statistically significant ( $\chi^2 = 4.3$ , 1df,  $P = 0.04$ ), which was consistent with the pathogenesis of PPR in these species. The lung samples were all negative on RT-PCR (Couacy-Hymann et al., 2002). Although this is the first serological evidence of PPR in Tunisia, no clinical signs were reported in the sampled animals. The similarity in clinical presentation between PPR with other diseases such as bluetongue and sheep-pox, endemic in Tunisia, may account for this finding (Ozmen et al., 2009).

In our serological assessment of RVF, given an assumed prevalence of at least 1% (CI 99.5%), a sample size of 527 was required to detect at least one positive animal. This number was considered as an indicator given our sampling was not random but focused on high-risk areas. All of the 610 samples tested were found negative (De Blas et al., 2000). Since the ELISA we used to screen for RVF is highly sensitive (99–100%) (Paweska et al., 2005) we concluded

\* Corresponding author. Tel.: +33 467 593911; fax: +33 467 593798.  
E-mail address: [catherine.cetre-sossah@cirad.fr](mailto:catherine.cetre-sossah@cirad.fr) (C. Cêtre-Sossah).

**Table 1**

The geographical distribution of serum and mosquito samples. The numbers in brackets refer to the total number of animals species in the sampled regions. *Ae.*, *Aedes*; *An.*, *Anopheles*; *Cx.*, *Culex*.

	Sheep	Goats	Cattle	Camels	Total	Mosquito spp.	%
Bizerte	44 (6000)	0 (1500)	49 (6050)	0 (0)	93 (13,550)	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>An. labranchiae</i>	29 29 38 4
Kairouan	76 (102,300)	33 (9000)	82 (7000)	0 (0)	191 (118,300)	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i> <i>Cx. perexiguus</i> <i>Cx. laticinctus</i>	33.5 11 33.5 11 5.5 5.5
Kébili	21 (14,500)	27 (13,800)	0 (110)	28 (1930)	76 (30,340)	<i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i> <i>An. sergenti</i>	33.5 33.5 33
Médenine	0 (130,000)	1 (50,000)	0 (230)	7 (1700)	8 (181,930)	<i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i>	50 50
Nabeul	67 (39,980)	49 (7430)	59 (17,480)	0 (0)	175 (64,890)	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i>	26 36 26 9
Sousse	55 (103,500)	9 (7300)	3 (1600)	0 (0)	67 (112,400)	<i>Ae. caspius</i> <i>Ae. detritus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i>	41.5 11.5 41.5 5.5
Total	263 (396,280)	119 (89,030)	193 (32,470)	35 (3630)	610 (521,410)		

**Table 2**

Seroprevalence of peste-des-petits-ruminants in sheep and goats in six regions of Tunisia. SP, seroprevalence.

	Total sheep/positive sheep (% SP)	Total goats/positive goats (% SP)	Total animals/positive animals (% SP)
Bizerte	44/3 (6.8%)	0/0 (0%)	44/3 (6.8%)
Kairouan	76/8 (10.5%)	33/9 (27.3%)	109/17 (15.6%)
Kébili	21/2 (9.5%)	27/4 (14.8%)	48/6 (12.5%)
Médenine	0/0 (*)	1/1 (*)	1/1 (*)
Nabeul	67/1 (1.5%)	49/0 (0%)	116/1 (0.9%)
Sousse	55/1 (1.8%)	9/0 (0%)	64/1 (1.6%)
Total	263 (15%)	119 (14%)	382/29 (7.6%)
Percentage	5.7%	11.8%	7.6%

\* Seroprevalence not representative.

that there was no serological evidence of infection in these regions despite the presence of several potential mosquito vectors (Table 1; Fig. 1) (Moutailler et al., 2008).

*Culex theileri* was present in all regions except Bizerte. Two species of *Anopheles* (*An. sergenti* and *An. labranchiae*) were found at very low density in Kebili and Bizerte, respectively. Few larvae of *Culex perexiguus* or *laticinctus* were identified in Kairouan. Species of the *Aedes* (*Ae. caspius* and *Ae. detritus*) and *Culex* (*Cx. pipiens* and *Cx. theileri*) genus frequently found are considered important in the transmission and persistence of RVF (Gad et al., 1987). RVF virus has been isolated from both *Cx. pipiens* and *Cx. theileri* during outbreaks in Egypt and South Africa (Gear et al., 1955; Hoogstraal et al., 1979). However, although these vectors are present in Tunisia, our serological data did not indicate animal infection.

The abundant trading in ruminants between Tunisia and neighbouring Algeria, Libya, Mauritania and Mali, emphasise the potential high risk of RVF transmission. A larger national survey will be required to validate the findings of this pilot serological study and

sentinel herds should be established to monitor the possible introduction of RVF in Tunisia. The justification for the continuation of the emergency vaccination program against these two diseases remains valid.

#### Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

#### Acknowledgements

The authors thank the French Ministry of Foreign Affairs (CMCU-Project 06/0902) and the RIIP (Pasteur International PhD Grant) for their funding and the field veterinarians and farmers for their help in sample collection.

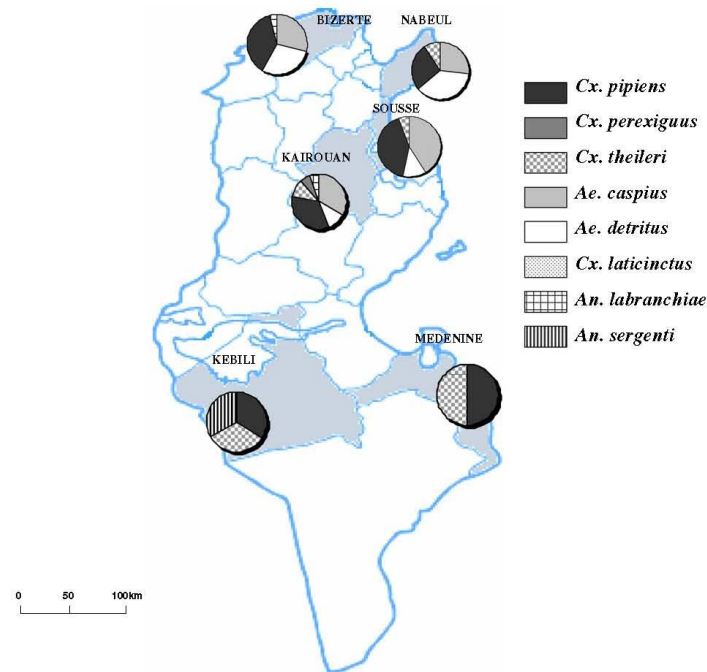


Fig. 1. Map illustrating the six regions of Tunisia sampled (grey shading). Pie charts represent the distribution of mosquito species identified. *Ae.*, *Aedes*; *An.*, *Anopheles*; *Cx.*, *Culex*.

## References

- Couacy-Hymann, E., Roger, F., Hurard, C., Guillou, J.P., Libeau, G., Diallo, A., 2002. Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *Journal of Virological Methods* 100, 17–25.
- De Blas, N., Ortega, C., Frankena, K., Noordhuizen, K., Thrusfield, M., 2000. Win Episcope 2. Version 2.0. <<http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope>>.
- Faye, O., Diallo, M., Diop, D., Bezeid, O.E., Bâ, H., Niang, M., Dia, I., Mohamed, S.A., Ndiaye, K., Diallo, D., Ly, P.O., Diallo, B., Nabeth, P., Simon, F., Lô, B., Diop, O.M., 2007. Rift Valley fever outbreak with East-Central African virus lineage in Mauritania, 2003. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1016–1023.
- Gad, A.M., Hassan, M.M., el Said, S., Moussa, M.I., Wood, O.L., 1987. Rift Valley fever virus transmission by different Egyptian mosquito species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 694–698.
- Gear, J.H.S., De Meillon, B., Le Roux, A.F., Kofsky, R., Innes, R.R., Steyn, J.J., 1955. Rift Valley fever in South Africa; a study of the 1953 outbreak in the Orange Free State with special references to the vectors and the possible reservoirs hosts. *South African Medical Journal* 29, 514–518.
- Hoogstraal, H., Meegan, J.M., Khalil, G.M., Adham, F.K., 1979. The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977–78. 2. Ecological and entomological studies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 624–629.
- Libeau, G., Prehaud, C., Lancelot, R., Colas, F., Guerre, L., Bishop, D.H.L., 1995. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to Peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Research in Veterinary Science* 58, 50–55.
- Moutailler, S., Krida, G., Schaffner, F., Vazeille, M., Failloux, A.B., 2008. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8, 749–754.
- Ozmen, O., Kale, M., Haligur, M., Yavru, S., 2009. Pathological, serological, and virological findings in sheep infected simultaneously with Bluetongue, peste-des-petits-ruminants, and Sheep-pox viruses. *Tropical and Animal Health Production* 41, 951–958.
- Paweska, J.T., Mortimer, E., Leman, P.A., Swanepoel, R., 2005. An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. *Journal of Virological Methods* 127, 10–18.

---

**Titre :** Contribution au développement d'un modèle vaccinal recombinant pour le contrôle de trois infections virales majeures des ruminants, la variole, la Peste des Petits Ruminants (PPR) et la Fièvre de la Vallée du Rift (FVR) adaptés à la situation épidémiologique des pays du Maghreb.

---

## Résumé

L'objectif de cette thèse est le développement d'un vaccin recombinant capripoxvirus protégeant contre la variole des ruminants, la Fièvre de la Vallée du Rift (FVR) et la Peste des Petits Ruminants (PPR) comme modèle vaccinal destiné aux pays atteints par ces infections. Une première partie de ce travail a consisté en une enquête sérologique en Tunisie pour évaluer les prévalences PPR et FVR. L'enquête menée a montré une séroprévalence PPR de 7,6% et l'absence de FVR. Le risque lié à une infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift n'est pas nul en raison de l'identification des vecteurs compétents *Culex theileri* et *Culex pipiens* dans les zones échantillonnées. L'élaboration du vaccin capripoxvirus FVR-PPR porte sur l'expression des gènes NSmG<sub>N</sub>-FVR et H-PPR où chacune des valences est insérée dans le site de la thymidine kinase et le site d'un analogue du récepteur à l'interleukine 8 respectivement. Le vecteur choisi pour la souche vaccinale Kenya Sheeppox-1. Bien que nos travaux aient conduit à l'obtention du capripoxvirus double recombinant, ce dernier n'a pu être purifié. L'alternative a donc été d'évaluer l'effet protecteur et l'immunogénicité induits par le simple recombinant capripoxvirus- NSmG<sub>N</sub>-FVR, qui est un produit de l'étape intermédiaire dans l'élaboration du double recombinant FVR-PPR. L'effet protecteur de notre construction a été validé par deux expérimentations chez des souris *Mus m. musculus* MBT/Pas, avec épreuve infectieuse. Le nombre de doses administrées, les voies d'administration ont été déterminants dans cette protection justifiée par l'obtention d'anticorps neutralisants anti-FVR. L'étude de l'immunogénicité a été réalisée sur un modèle caprin sans épreuve infectieuse, une séroconversion FVR a été observée. La lymphoprolifération et le typage des sous populations lymphocytaires ont été analysés.

---

**Title :** Development of a capripoxvirus based recombinant vaccine for the control of three major viral infections of ruminants, small pox, Peste des Petits Ruminants (PPR) and Rift Valley Fever (RVF), related to the epidemiological situation of the Maghreb North-African countries.

---

The aim of this thesis was to develop a capripoxvirus based recombinant vaccine against ruminant pox, Rift Valley fever (RVF) and peste des petits ruminants (PPR) considered as a vaccine model for countries affected by these infections. The first part of the work consisted in a serological survey conducted in Tunisia to detect the PPR and RVF presence. A PPR seroprevalence of 7.6% has been found and no antibodies against RVF were detected. However, the risk of infection with rift valley fever virus persists since competent vectors such as *Culex pipiens* and *Culex theileri* has been identified in the sampled areas. The development of the RVF-PPR vaccine candidate is based on the NSmG<sub>N</sub>-FVR and H-PPR gene expression - where each of the genes is inserted into the thymidine kinase and the Interleukin 8 receptor analogue genes, respectively. The vector chosen is the vaccine strain Sheeppox Kenya-1. Although the double recombinant RVF-PPR has been produced, it could not be purified. The alternative was to evaluate the protection and the immunogenicity of the single recombinant capripoxvirus NSmG<sub>N</sub>-FVR, which is a product of an intermediate step of the process of the double recombinant preparation. The protection of our vaccine candidate has been performed by two mice experiments in *Mus m. musculus* MBT/Pas, with challenge. The number of doses, the route of administration played a key role in the protection confirmed by the presence of neutralizing anti-RVF antibodies. The study of the immunogenicity of the vaccine candidate was conducted in goats without challenge, RVF seroconversion has been shown. Lymphoproliferation studies and lymphocytes subpopulations typing have been analysed.

**Mots clés :** Vaccinologie, Capripoxvirus, FVR, PPR, Tunisie

**Discipline :** Biologie

**Laboratoire de thèse :** CIRAD - Département Bios, UMR CMAEE, "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Groupe Virologie